



Theses and Dissertations

2008

Effect of three cryoconservation diluents on sperm motility and vitality in the ejaculate of bulbourethral-ectomized llamas (*Lama glama*), department of La Paz

Edwin Eddy Maceda Tintaya
Brigham Young University - Provo

Follow this and additional works at: <https://scholarsarchive.byu.edu/etd>



Part of the [Animal Sciences Commons](#)

BYU ScholarsArchive Citation

Maceda Tintaya, Edwin Eddy, "Effect of three cryoconservation diluents on sperm motility and vitality in the ejaculate of bulbourethral-ectomized llamas (*Lama glama*), department of La Paz" (2008). *Theses and Dissertations*. 5391.

<https://scholarsarchive.byu.edu/etd/5391>

This Thesis is brought to you for free and open access by BYU ScholarsArchive. It has been accepted for inclusion in Theses and Dissertations by an authorized administrator of BYU ScholarsArchive. For more information, please contact ellen_amatangelo@byu.edu.

UNIVERSIDAD CATOLICA BOLIVIANA
"SAN PABLO"
UNIDAD ACADÉMICA CAMPESINA TIAHUANACO
CARRERA INGENIERIA ZOOTECNICA



TESIS DE GRADO

“EFECTO DE TRES DILUTORES SOBRE LA MOTILIDAD
Y VITALIDAD ESPERMÁTICA EN LA
CRIOCONSERVACION DEL EYACULADO DE LLAMA
(*Lama glama*) BULBOURETRECTOMIZADO,
DEPARTAMENTO DE LA PAZ”

Presentada por :

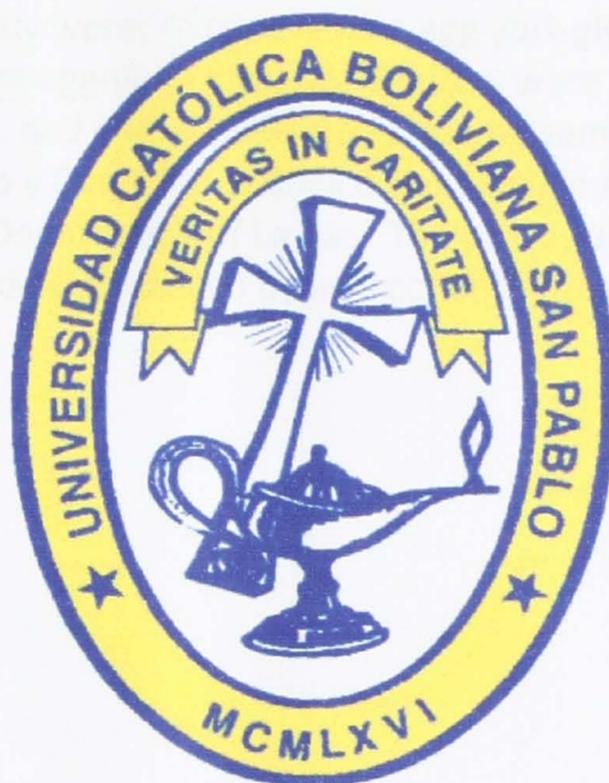
EDWIN EDDY MACEDA TINTAYA

Para obtener el Título Académico de Licenciatura en:
INGENIERIA ZOOTECNICA

LA PAZ - BOLIVIA

2008

UNIVERSIDAD CATOLICA BOLIVIANA
“SAN PABLO”
UNIDAD ACADÉMICA CAMPESINA TIAHUANACO
CARRERA INGENIERIA ZOOTECNICA



TESIS DE GRADO

**“EFECTO DE TRES DILUTORES SOBRE LA
MOTILIDAD Y VITALIDAD ESPERMÁTICA EN LA
CRIOCONSERVACION DEL EYACULADO DE LLAMA
(*Lama glama*) BULBOURETRECTOMIZADO,
DEPARTAMENTO DE LA PAZ”**

Presentada por:

EDWIN EDDY MACEDA TINTAYA

**Para obtener el Título Académico de Licenciatura en:
INGENIERIA ZOOTECNICA**

**LA PAZ – BOLIVIA
2008**

Effect of Three Cryoconservation Diluents on Sperm Motility and Vitality in the Ejaculate of Bulbourethral-ectomized Llamas (*Lama glama*) – Department of La Paz

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the effects of three different diluents used during the cryopreservation process on the motility and vitality of sperm cells. The three diluters used in this study were: A) trice-serum-egg yolk-glycerin, B) serum-egg yolk-glycerin, and C) Dulbecco's serum-egg-yolk- glycerin. Diluters were tested in proportions of 64-15-15-6% (N1), 54-20-20-6% (N2), and 44-35-15-6% (N3). Llama semen was collected at the Mejoramiento Genético y Diagnóstico Clínico Del Servicio Agropecuario (SEDAG) in the Los Andes Province of the Department of La Paz. The procedure took place at the Unidad Académica Campesina de Tiahuanaco by a direct optimized bulbourethral collection method with an artificial vagina.

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad Académica Campesina, Tutorado de la Universidad Católica Boliviana en
para Mayor de las actividades.

Al personal Docente de la carrera Ingeniería en Zoológico, por su valioso conocimiento y
transmisión de su saber profesional.

Al Profesor Pedro Urdinola Cruz, Director General de la UACUB por la
habilitación y autorización de nombre Ingeniería en Zoológico.

Al Sr. Mario Rojas, jefe de Carrera por su apoyo y confianza en

DEDICATORIA

Con profundo cariño y eterna gratitud,
a mis queridos Padres y amigos
Víctor y Justa, quienes con amor,
esfuerzo y abnegación hicieron
posible mi formación

Al Sr. Z. Santiago Cruz Quispe por la colaboración y apoyo brindado en la ejecución de
mi formación y realización de prácticas.

A mi amigo Víctor E. Salazar y a su familia por su apoyo y compañía en momentos difíciles.

Con inmensa gratitud a mis
hermanos: Santos Angel, Virginia y
Tania Danitza, con quienes
compartimos muchos éxitos y me
brindaron su cariño y apoyo en la
adversidad.

A Carmen Laura y a mi hija Laura
Belén quienes me brindaron apoyo
moral en todo momento, para lograr
este mi objetivo

A Emily, mi sobrina

EDWIN EDDY

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad Académica Campesina Tiahuanaco de la Universidad Católica Boliviana el alma Mater de mis conocimientos.

Al plantel Docente de la carrera Ingeniería en Zootecnia, por su valiosa enseñanza y conducción de mi formación profesional.

Al Reverendo Padre Claudio Patty Choque, Director General de la UACT-UCB por la institución y consolidación de carrera, Ingeniería en Zootecnia.

Ing. Mario Acho, Jefe de Carrera Ingeniería Zootécnica, por su respaldo y confianza en toda mi formación académica

A la Lic. Bqmc. Farm. Nicolasa Lourdes Vino Nina, por el apoyo incondicional en la realización de la presente investigación.

Al MVZ Santiago Copa Quispe por la colaboración y apoyo acertado en la dirección de mi formación y realización del presente trabajo.

A mi amigo Victor E. Gonzales V. por su apoyo incansable durante el trabajo de campo y su compañía en momentos inolvidables.

A todos mis compañeros y amigos quienes compartieron su amistad y me brindaron apoyo moral durante mi estadía universitaria.

A Rubén Zúñiga y Yolanda Ríos, quienes contribuyeron y brindaron su atención como dos verdaderos amigos al final de este trabajo.

A la Prefectura del departamento de la Paz quienes, por medio del SEDAG "Servicio Departamental Agropecuario", por brindar el uso de sus laboratorios.

Y un especial agradecimiento a BENSON AGRICULTURE AND FOOD INSTITUTE (Provo - Utah), por su cooperación financiera para la realización del presente trabajo y al Dr. Todd Robinson por su valiosa contribución.

RESUMEN

En los laboratorios de Mejoramiento Genético y Diagnóstico Clínico del Servicio Departamental Agropecuario (SEDAG) de la Prefectura del Departamento de La Paz, Provincia Los Andes, se colectó eyaculado de llama bulbouretrectomizado, intervenido quirúrgicamente en la Unidad Académica Campesina de Tiahuanaco, por el método de colección directa con vagina artificial, con el objetivo de evaluar el efecto de tres dilutores; (A): tris-suero-yema-glicerina; (B): PBS.-suero-yema-glicerina y (C): Dulbecco's-suero-yema-glicerina, en proporciones de: 64-15-15-6 % (N1), 54-20-20-6 % (N2) y 44-35-15-6 % (N3); sobre la motilidad y vitalidad de las células espermáticas en el proceso de crioconservación. Para A, B y C, los dilutores fueron adicionados, en una primera etapa, sin glicerina a 30° C y refrigerándose lentamente hasta conseguir los 4° C donde se adicionó la segunda fracción con glicerina en intervalos de 15 min, para empajillar, sellar y llevarlos a vapores de nitrógeno líquido, y sumergirlos (Decuadro-Hansen, 1997). La evaluación de la motilidad y vitalidad espermática se realizó en la etapa de colección, al final de la refrigeración, al final de la congelación y a la segunda semana después de la congelación. Los resultados promedio de motilidad y vitalidad para efecto dilutor fueron: 29.85% y 34.82% para dilutor Dulbecco's, superior ($P \leq 0.05$) a los dilutores Tris y PBS. Los Niveles protocolares 1 y 2 fueron superiores ($P \leq 0.05$) al nivel 3, con porcentajes de 26.71%; 27.07% y 31.17%; 30.94% para motilidad y vitalidad respectivamente. El efecto del proceso de crioconservación disminuyó notablemente la motilidad y vitalidad espermática, los que respectivamente, descendieron de una etapa de colecta con 64.00 y 73.00%, llegando a la refrigeración con 53.79 y 62.54%, descendiendo aun mas al descongelado con 12.86 y 15.02% y a las 2 semanas de haber congelado llego a obtenerse 12.03 y 13.79%. Posiblemente se deba a los efectos del proceso de crioconservación, los que repercutieron negativamente sobre la estructura y función de la membrana, aparato motor y núcleo del espermatozoide, haciendo una ecuación biofísica compleja en el que interviene la calidad de dilutor, crioprotector, tiempos y temperaturas de exposición, para determinar el punto de *seeding* y éxito en la crioconservación de espermatozoides.

CONTENIDO

| | Pág. |
|--|------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Objetivos..... | 2 |
| 1.1.1. Objetivo general..... | 2 |
| 1.1.2. Objetivos específicos..... | 2 |
| 1.2. Hipótesis..... | 3 |
| 2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA | 4 |
| 2.1. Anatomía y Fisiología del aparato reproductor de la llama (macho)... | 4 |
| 2.1.1. Testículos..... | 4 |
| 2.1.2. Epidídimo y conducto deferente..... | 5 |
| 2.1.3. Glándulas accesorias..... | 5 |
| 2.1.3.1. Glándulas vesiculares..... | 6 |
| 2.1.3.2. Glándulas prostáticas..... | 6 |
| 2.1.3.3. Glándulas bulbouretrales..... | 6 |
| 2.1.4. Pene..... | 7 |
| 2.2. Selección de machos..... | 7 |
| 2.3. Semen..... | 7 |
| 2.3.1. Calidad de semen..... | 8 |
| 2.3.2. Características físico químicas del semen..... | 8 |
| 2.3.3. Características físico químicas del plasma seminal..... | 9 |
| 2.4. Colección del semen..... | 9 |
| 2.5. Evaluación..... | 9 |
| 2.5.1. Características macroscópicas..... | 10 |
| 2.5.1.1. pH..... | 10 |
| 2.5.1.2. Aspecto..... | 10 |
| 2.5.1.3. Volumen..... | 11 |
| 2.5.1.4. Color..... | 11 |
| 2.5.2. Características microscópicas..... | 11 |
| 2.5.2.1. Concentración espermática..... | 11 |
| 2.5.2.2. Motilidad espermática..... | 12 |
| 2.5.2.3. Vitalidad espermática..... | 12 |
| 2.6. Diluyentes del semen..... | 13 |
| 2.6.1. Composición..... | 13 |
| 2.6.2. Concentración de electrolitos..... | 13 |
| 2.6.3. Elementos protectores..... | 14 |
| 2.6.4. Antibióticos..... | 14 |
| 2.6.5. Algunos dilutores utilizados en otras especies..... | 15 |
| 2.7. Procesamiento..... | 15 |
| 2.8. Refrigeración..... | 16 |
| 2.9. Conservación..... | 16 |
| 2.10. Evaluación post descongelado..... | 17 |
| 3. MATERIALES Y METODOS | 18 |
| 3.1. Materiales..... | 18 |
| 3.1.1. Animales de estudio..... | 18 |
| 3.1.2. Materiales para la colección del eyaculado..... | 18 |
| 3.1.3. Materiales y equipos para la evaluación del eyaculado..... | 18 |
| 3.1.4. Materiales y equipos para la dilución, refrigeración y conservación del eyaculado..... | 19 |
| 3.2. Método..... | 20 |
| 3.2.1. Lugar de estudio..... | 20 |
| 3.2.2. Preselección de animales..... | 20 |
| 3.2.3. Adiestramiento de los animales..... | 21 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.2.4. | Selección de los animales de estudio..... | 21 |
| 3.2.5. | Colección del eyaculado..... | 22 |
| 3.2.6. | Evaluación del eyaculado..... | 22 |
| 3.2.6.1. | Características macroscópicas..... | 22 |
| 3.2.6.1.1. | pH..... | 22 |
| 3.2.6.1.2. | Viscosidad..... | 22 |
| 3.2.6.1.3. | Volumen..... | 22 |
| 3.2.6.1.4. | Color..... | 23 |
| 3.2.6.2. | Características microscópicas..... | 23 |
| 3.2.6.2.1. | Motilidad espermática..... | 23 |
| 3.2.6.2.2. | Concentración espermática..... | 24 |
| 3.2.6.2.3. | Vitalidad espermática..... | 25 |
| 3.2.7. | Dilutores..... | 26 |
| 3.2.7.1. | Esterilización de materiales y reactivos..... | 26 |
| 3.2.7.2. | Preparación del TRIS..... | 27 |
| 3.2.7.3. | Preparación del PBS..... | 28 |
| 3.2.7.4. | Preparación del DULBECCO's..... | 28 |
| 3.2.7.5. | Dilución del eyaculado..... | 28 |
| 3.2.7.5.1. | Primera dilución..... | 29 |
| 3.2.8. | Refrigeración..... | 30 |
| 3.2.8.1.1. | Segunda dilución..... | 30 |
| 3.2.8.1.2. | Empajillado..... | 30 |
| 3.2.8.1.3. | Sellado..... | 30 |
| 3.2.8.1.4. | Marcado..... | 31 |
| 3.2.9. | Conservación..... | 31 |
| 3.2.10. | Evaluación post descongelado..... | 32 |
| 3.3. | Factores en estudio..... | 32 |
| 3.4. | Variables de respuesta..... | 33 |
| 3.5. | Análisis estadístico..... | 33 |
| 4. | RESULTADOS Y DISCUSIONES | 34 |
| 4.1. | Descripción del Eyaculado en la etapa de Colección..... | 34 |
| 4.2. | Motilidad espermática por el efecto de dilutores y niveles protocolares en el proceso de crioconservación..... | 35 |
| 4.2.1. | Motilidad espermática por el efecto de tres Dilutores..... | 36 |
| 4.2.2. | Motilidad espermática por el efecto de tres Niveles protocolares..... | 38 |
| 4.2.3. | Motilidad espermática durante el proceso de crioconservación..... | 39 |
| 4.2.4. | Interacción de Dilutores por Etapas de evaluación..... | 43 |
| 4.3. | Vitalidad espermática por el efecto de dilutores y niveles protocolares en el proceso de crioconservación..... | 46 |
| 4.3.1. | Vitalidad espermática por el efecto de tres Dilutores..... | 47 |
| 4.3.2. | Vitalidad espermática por el efecto de tres Niveles protocolares..... | 48 |
| 4.3.3. | Vitalidad espermática durante el proceso de crioconservación..... | 50 |
| 4.3.4. | Interacción de Dilutores por Etapas de evaluación..... | 54 |
| 4.3.5. | Interacción de Niveles protocolares por Etapas de evaluación..... | 57 |
| 4.3.6. | Interacción de Dilutores por Niveles protocolares por Etapas de evaluación..... | 60 |
| 5. | CONCLUSIONES | 61 |
| 6. | RECOMENDACIONES | 63 |
| 7. | BIBLIOGRAFÍA | 65 |
| 8. | ANEXOS | |

1. INTRODUCCIÓN

La crianza de camélidos sudamericanos es considerada como una de las actividades más antiguas del occidente boliviano y hoy en día aumenta el interés de fortalecer su producción por las características especiales de la carne de llama y alpaca. A este hecho se suma la creciente aceptación de sus derivados, por sus características sobresalientes del grado de finura de fibra y la peculiaridad estructural del cuero, razones que han permitido convertir en uno de los pilares del desarrollo auto sostenido de los campesinos involucrados en la crianza y explotación de esta especie.

La práctica de la congelación de semen e inseminación artificial, tan extendida actualmente por todas las latitudes y muy estudiadas en otras especies animales, dio ventajas en el mejoramiento genético, control de enfermedades venéreas, disponibilidad de registros precisos de reproducción para un buen manejo de la terna, servicio económico, seguridad al eliminar machos de bajos rendimientos en el hato, además, por medio de la congelación de semen se pudo conservar material genético de buen valor por un lapso de tiempo prolongado y logró constituirse en una herramienta que aumentó el número de animales en la explotación ganadera.

Se ha observado que el semen de camélidos presenta una alta viscosidad que limita la evaluación de criterios habituales en otras especies (volumen, motilidad, concentración, morfología espermática), factor que no permite reflejar necesariamente las características de un eyaculado normal (Von Baer, M.V., 1998), debido a la secreción producida por las glándulas bulbouretrales (Laruta, D., 2002), que afecta en la criopreservación de semen mediante métodos

convencionales (Valdivia, M. et al., 2003). En cambio la extirpación quirúrgica de las glándulas bulbouretrales, permite obtener un producto libre de viscosidad con una distribución homogénea de espermatozoides suspendidos en el eyaculado de llama (Gonzales, V. et al., 2003), hasta ahora no sometido a la crioconservación.

Si bien se crioconserva semen de animales que carecen de viscosidad, es importante establecer la reacción que pueda tener un eyaculado de llama con suspensión de espermatozoides distribuidos homogéneamente, durante el proceso de crioconservación, para la obtención de pajuelas que posibiliten aún más la multiplicación y mejoramiento genético de las llamas por medio de la inseminación artificial.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto de tres dilutores sobre la motilidad y vitalidad espermática en el proceso de crioconservación del eyaculado de llama bulbourectomizado.

1.1.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los dilutores en la motilidad espermática del eyaculado, en tres niveles durante el proceso de crioconservación.
- Evaluar el efecto de los dilutores en la vitalidad espermática del eyaculado, en tres niveles durante el proceso de crioconservación.

1.2. HIPÓTESIS DELICORRÁTICA

- No existen diferencias significativas en la motilidad espermática del eyaculado por efecto de tres dilutores, en tres niveles durante el proceso de crioconservación.
- No existen diferencias significativas en la vitalidad espermática del eyaculado por efecto de tres dilutores, en tres niveles durante el proceso de crioconservación.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1. Anatomía y Fisiología del aparato reproductor de la llama macho

2.1.1. Testículos

Los testículos están ubicados en un escroto no pendular, en la parte inferior de la región perineal a 10 cm promedio por debajo del ano, siendo de consistencia turgente y elástica. El epidídimo es pequeño firmemente conectado con los testículos, que consta de tres partes: cabeza, cuerpo y cola, estos forman en conjunto una "J" invertida (Alanocca, F., 1978).

El testículo de la llama pesa cerca de 12 g a los 2.5 años (83 kg de peso vivo del animal), y mide de 3.5 cm por 2.2 cm, con un volumen de 13 ml. A los 5.5 años de edad, el testículo de la llama pesa cerca de 24 g, y mide 5.0 cm por 2.7 cm, con un volumen de 22 ml. Hay una variación considerable respecto del tamaño del testículo y el peso vivo en llamas y alpacas; el peso de cada testículo varía entre 0.02 y 0.03% del peso corporal (Hafez, E., 2000).

Normalmente ambos testículos son del mismo tamaño, el peso testicular promedio de estos animales es de 18 g. Los reproductores se seleccionan por el tamaño testicular como ocurre en otras especies domésticas, asumiéndose que existe una relación directa entre el tamaño testicular y la producción espermática, además de formar gametos (Sumar, J., 1984).

2.1.2. Epidídimo y conducto deferente

Se reconocen tres regiones anatómicas del epidídimo. Su cabeza en la que una cantidad variable de conductos eferentes se unen al conducto epididimario. La región media de cada conducto eferente muestra notable actividad secretoria. Los dos primeros segmentos se encargan de la maduración de los espermatozoides, mientras que el terminal se destina a su almacenamiento (Hafez, E., 2000).

La mucosa del conducto deferente está dispuesta en pliegues longitudinales. Cerca del extremo epididimario, el epitelio se parece al del epidídimo, pues las células no ciliadas tienen poca actividad secretoria (Hafez, E., 2000).

2.1.3. Glándulas accesorias

Están conformados por la próstata y las glándulas bulbouretrales o de Cowper, las que proveen a los espermatozoides componentes químicos mediante sus secreciones y más del 90% del volumen total del plasma seminal. Estos tejidos accesorios producen grandes cantidades de sustancias biológicamente importantes como: Prostaglandina (200 ug/ml), Espermina (3 mg/ml), Fructosa (2 mg/ml), Acido Cítrico (4 mg/ml) y altas concentraciones de Zinc (150 µg/ml), Proteínas (40 mg/ml) y enzimas específicas como inmunoglobulinas, Proteasas, Esterasas y Fosfatasas. Hasta el momento, tenemos un conocimiento limitado de las funciones fisiológicas de estas secreciones, con la excepción de algunos papeles en los procesos de coagulación y lisis que ocurren en el plasma seminal. A partir de los conocimientos generados por las técnicas de reproducción asistida, se ha cuestionado la necesidad de las glándulas accesorias en los procesos de fertilización, mientras que en algunos mamíferos, al remover los espermias del

epidídimo, son capaces de fertilizar el ovocito; así mismo los espermias son capaces de fertilizar sin haber hecho contacto con las secreciones de la próstata o de las vesículas seminales (Sanz, E. et al., 2004).

2.1.3.1. Glándulas vesiculares

Las llamas y las alpacas así como los camélidos silvestres carecen de glándulas vesiculares o también llamada vesícula seminal (Dehlon, et al., 1986).

2.1.3.2. Glándulas prostáticas

La extirpación de la próstata en los animales en experimentación no va siempre acompañada de una disminución del poder fecundante del esperma, sobre todo si se mantiene el funcionamiento de las vesículas seminales y glándulas bulbouretrales; Inversamente las secreciones prostáticas pueden reemplazar a la de dichas glándulas (Kolb, E., 1979).

2.1.3.3. Glándulas bulbouretrales

Se encuentran en posición dorsal a la uretra, cerca de la terminación de su parte pélvica (Hafez, E., 2000). Las secreciones de las glándulas bulbouretrales son de una coloración blanco-azulina, de un aspecto mucoide y una consistencia densa, fuertemente viscosa (Charaja, W., 1999).

2.1.4. Pene

En el nacimiento, el pene está adherido por completo al prepucio. Estas adherencias desaparecen en forma gradual con el crecimiento del animal bajo la influencia de la testosterona. Al año de edad, los machos muestran interés sexual por las hembras; sin embargo, sólo cerca de 9% de las alpacas macho muestran una separación completa de las adherencias entre el pene y el prepucio y son capaces de realizar la copulación (Hafez, E., 2000).

2.2. Selección de machos

Para la selección de un reproductor macho o los donadores de semen deben ser de superioridad genética y además se debe considerar el historial genealógico, examen físico (finura de fibra, ojo albino, prognatismo, crecimiento muscular y otras características) y examen de semen (Pérez, G., 2000).

En el macho la pubertad se determina por la liberación del prepucio y del glande que se realiza entre los 18 y 24 meses de edad. La pubertad se define también con la formación de espermatozoides o la espermatogénesis, donde encontramos espermatozoides fértiles (Pérez, G., 2000).

2.3. Semen

El semen es el eyaculado que está compuesto de espermatozoides y plasma seminal: los testículos proveen los componentes celulares (espermatozoides) y las glándulas accesorias proveen la mayor parte de la porción líquida (plasma seminal). La contribución del epidídimo y conducto deferente al volumen del semen es relativamente pequeño (Bearden, H. Y Fuquay, J., 1982; Salisbury, G. Y Col., 1982; Derivaux, J., 1982).

2.3.1. Calidad de semen

Un gran número de factores afectan la calidad del semen, entre ellos, procedimientos de evaluación de semen, evaluación de la morfología espermática, reacciones bioquímicas, empaçado y transporte, control de enfermedades, técnicas de inseminación, y las interacciones entre el diluyente con factores como temperatura y tiempo del almacenamiento del semen, entre otros (Maqueda, L., 2001).

2.3.2. Características físico químicas del semen

Cuadro 1 Composición del semen de los animales domésticos

| | Carnero | Toro |
|--|-----------|----------|
| Semen: | | |
| Volumen (ml) | 0.5-2 | 2-10 |
| Concentración Esperm. (x10 ⁶ /ml) | 1000-5000 | 300-2000 |
| Espermatocrito (%) | 33 | 10 |
| pH | 5.9-7.3 | 6.5-7.0 |
| Densidad (g/ml) | | 1.035 |
| Motilidad (%) | 75 | 67 |
| Cel. A inseminar (10 ⁶) | 120 | 10 |
| Plasma seminal: | | |
| Proteínas (g/dl) | | 3-8 |
| Fructosa (mg/dl) | 150-600 | 1220-540 |
| Sorbitol (mg/dl) | 26-120 | 10-136 |
| Ácido cítrico (mg/dl) | 137 | 357-1000 |
| Ácido ascórbico (mg/dl) | 5 | 8.7 |
| Inositol (mg/dl) | 10-15 | 25-46 |
| Ergotioneina (mg/dl) | | Trazas |
| Ácido glutámico (mg/dl) | 76 | 35-41 |
| Glicerilfosforilcolina (mg/dl) | 1600-1200 | 110-500 |
| Sodio (mmol/l) | 778 | 117 |
| Potasio (mmol/l) | 23 | 44 |
| Calcio (mmol/l) | 1.9 | 9.3 |
| Magnesio (mmol/l) | 2.4 | 3.4 |
| Cloro (mmol/l) | 18 | 49 |
| Bicarbonato (mmol/l) | 7.1 | 7.1 |

Fuente: Illera, M., (1994)

2.3.3. Características físico químicas del plasma seminal

2.3.1. Características macroscópicas

El plasma seminal es la fracción líquida del semen después de haber separado los espermatozoides por centrifugación o filtración. El plasma seminal se caracteriza por contener una serie de sustancias que no se encuentran en ningún otro territorio orgánico (Illera, M., 1994).

2.4. Colección del semen

Se ha colectado semen en tubo semirígido de jebe de 24 cm de largo y por último se colectó utilizando vagina artificial modificada con el uso de vagina artificial modificada con el uso de una frazadilla eléctrica, manteniendo la temperatura entre 38 y 40 °C (Quispe, F., 1987).

Los camélidos sudamericanos presentan características muy peculiares en cuanto a la realización de la monta, razón por la cual desde la década de los 50 se han realizado numerosos ensayos utilizando métodos de colecta como son: mediante esponjas vaginales, electroeyaculación, vagina artificial dentro un maniquí, fístula uretral y fundas vaginales, obteniéndose buenos resultados mediante vagina artificial (Medina, G., 2002).

2.5. Evaluación

El semen de la alpaca es viscoso en todos los casos y puede ser altamente viscoso semejante a un gel (Achata, R., 1989; Quispe, F., 1987; Bravo, P.W., 1998), viscosidad que depende de las secreciones producidas por las glándulas bulbouretrales (Garnica, J. y Fuentes, C., 1998).

2.5.1. Características macroscópicas

2.5.1.1. pH

El semen de la llama a los tres años es de 7.8 ± 0.22 y a los 6 años es de 7.9 ± 0.21 con extremos de 7.95 a 7.82 (Garnica, J., 1998). Por otro lado, el pH encontrado en el semen de la llama es superior a la de bovinos, hasta con 8.6, señala (Von Baer y Helleman, 1998).

La medición del pH se viene utilizando el pH-metro en cinta, ya que otros pH-metros digitales no son prácticos, su utilización por la poca cantidad de semen de llamas es descartada. Los resultados obtenidos de pH fueron de 6.6 hasta 7.8. Para llamas y todo los camélidos Sudamericanos el pH es ligeramente alcalino, diferente a los ovinos y vacunos donde el semen tiende a pH ligeramente ácido (Medina, G., 2002).

2.5.1.2. Aspecto

La observación de la viscosidad del semen es subjetiva calificándose como: (+++) altamente viscoso, (++) viscoso y (+) ligeramente viscoso, esta condición que presenta el semen de la llama se considera como una barrera de dilución (Pérez, G., 2000). El aspecto de semen de llama es viscoso y gelatinoso, hecho que no permite diluir con dilutores comunes como en los ovino (Medina, G., 2002). Además esta alta viscosidad de los eyaculados no permite una preparación adecuada de las muestras para el examen (Bravo, P.W., 1997).

2.5.1.3. Volumen

El volumen de semen colectado en llamas es el siguiente: a los tres años de 3.74 ± 0.61 ml, a los seis años se obtuvo 3.43 ± 0.49 ml, obteniendo en promedio de 3.58 ± 0.84 ml de semen eyaculado, es la porción ocupado dentro del tubo colector, se mide en centímetros cúbicos, además varía entre 1 a 6 ml (Pérez, G., 2000).

2.5.1.4. Color

El semen debe tener aspecto opaco y relativamente uniforme, indicativo de alta concentración de células espermáticas. Las muestras traslúcidas contienen pocos espermatozoides, debiéndose desechar semen con aspecto lechoso o con fragmentos de material, pues ello indica infección (Hafez, E., 2000).

El semen de llama varía de cristalino opaco con una concentración espermática de 30 a 100×10^6 espermatozoides/ml, gris con concentración de 150 a 210×10^6 espermatozoides/ml y ligeramente lechoso con 300 a 600×10^6 espermatozoides/ml (Pérez, G., 2000).

2.5.2. Características microscópicas

2.5.2.1. Concentración espermática

La concentración se mide en una cámara Neubauer que cuenta con pequeñas cámaras numeradas de precisión, en el que se introduce eyaculado diluido por un hemocitómetro. La cantidad de espermatozoides en la cámara se cuenta manualmente, lo cual pese a tomar mucho tiempo, es muy exacto (Hafez, E., 2000).

La concentración espermática, en cópulas cuya duración fue de 0 a 5 minutos. fueron 44.5×10^6 espermatozoides/ml; de 6 a 10 min. 46.40×10^6 espermatozoides/ml, de 11 a 15 min. 93.70×10^6 espermatozoides/ml y cópulas que sobrepasaron los 20 min. 123.30×10^6 espermatozoides/ml (Bravo, V., 1998).

2.5.2.2. Motilidad espermática

La valoración cualitativa de la motilidad implica estimación subjetiva de los espermatozoides y no tanto así la evaluación porcentual de motilidad. Los parámetros de motilidad incluyen: Porcentaje de espermatozoides en movimiento (lo normal es que 70 a 90% muestren motilidad); porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva; velocidad espermática (con base a una escala arbitraria de 0, estacionaria, a 4 rápida); longevidad de la motilidad espermática en semen puro (a temperatura ambiente de 20 a 25 °C) y en semen diluido (a temperatura ambiente, o temperatura refrigerada de 4 a 6 °C), (Hafez, E., 2000).

2.5.2.3. Vitalidad espermática

Se tiene una buena motilidad cuando se tiene mas del 60% de espermatozoides vivos, motilidad regular entre 40 a 60% espermatozoides vivos y motilidad baja cuando se tiene menor al 40% de espermatozoides vivos (Quispe, F., 1987), además que este también varía según al efecto de periodicidad de colección de semen del macho (Bravo, P.W., 1998).

2.6. Diluyentes del semen

En general el contenido de un dilutor, sus funciones y componentes son:

2.6.1. Composición

Las sustancias que componen el diluyente, deben cumplir las necesidades fisiológicas de la célula para favorecer su mantenimiento (Rillo, S., 1982).

La mayoría de los diluyentes contienen glucosa como principal fuente de energía, aunque otras fuentes como galactosa, fructosa, ribosa, y trealosa han sido utilizadas sin tener muchas ventajas sobre la glucosa (Maqueda, L., 2001).

Debe poseer sustancias nutritivas o elementos que favorezcan el metabolismo, vitalidad, longevidad y poder fecundante de los espermatozoides (Villena, E. et al., 2002).

2.6.2. Concentración de electrolitos

Investigadores que trabajan con un medio que contiene tris y ácido cítrico consideran mas interesante la hipo tonicidad (Rillo, S., 1982).

El pH de la fracción rica del semen es 6.8 a 7.4 y de la fracción post-espermática es 7.0 a 7.6. Los espermatozoides y las bacterias contenidas en el semen, producen algunos metabolitos como ácido láctico, por lo que las sustancias buffer son necesarias en la preservación del semen. Buffers simples como el bicarbonato de sodio tienen una acción limitada, mientras que sustancias como el ácido 3N-Morfolino propanesulfónico (MOPS) o el ácido N-2-hidroxietil piperazin-N-2-etanosulfónico (HEPES) tienen una mejor acción (Maqueda, L., 2001).

El dilutor debe tener una presión osmótica isotónica con la del semen (es decir, igual concentración de sales minerales, ya que, de otro modo, el tránsito de las mismas para igualar presiones acaba matando a los espermatozoides) que permita su mantenimiento (Villena, E., et al., 2002).

2.6.3. Elementos protectores

Estabilizadores de la membrana se adicionan con el fin de prevenir o retardar alteraciones no deseadas en la estructura y la función de las membranas de los espermatozoides. Las principales sustancias utilizadas son seroalbúmina bovina (BSA), hidroxitolueno butilado (BTH), etilén disódico diamino tetraacetato (EDTA), polivinil pirrolidona (PVP-40), y alcohol polivinílico (Maquera, L., 2001).

En proporciones de yema de huevo al 10%, Glicerina al 7% ó la yema de huevo al 20% y Glicerina al 4.7%, son dos componentes protocolares que se utilizaron y ofrecieron mejores resultados, contra la protección de las bajas temperaturas, en procesadoras de semen de toro (Illera, M., 1994).

2.6.4. Antibióticos

Tanto el Consorcio Inglés del Mercado de Leche como el Ministerio Británico de Agricultura Pesca y Alimentos utilizan como componente antibacteriano, la Penicilina en proporción de 500 U.I. y la Estreptomina en 0.5 mg (Illera, M., 1994). Los antibióticos más utilizados actualmente son gentamicina, lincomicina, neomicina y espectinomicina (Maquera, L., 2001).

La utilización de productos antibacterianos en los medios diluyentes no excluye sin embargo la necesidad de practicar la recolección rutinaria del semen en las mejores condiciones higiénicas con el fin de reducir al mínimo la contaminación de las muestras (Villena, E., 2002)

2.6.5. Algunos dilutores utilizados en otras especies

El TRIS-citrato-fructosa y Lactosa-yema de huevo-glicerina fue utilizado para la congelación de semen de ovinos (Waldspurger, K., 1987), la compañía IMV cita la utilización del BIOCIPHOS PLUSTM y el LAICIPHOS 488 para la congelación de semen bovino (Decuadro-Hansen, 1997), así como el Citrato Sodio Glucosa, Tris, Lardy-Philips y PBS para la conservación de semen de alpacas (Mendoza, C., 2000.).

2.7. Procesamiento

El procesamiento del semen enfriándolo a 5 °C es similar, ya sea que se use congelado o sin congelar. El semen se colecta a la temperatura corporal. Después de la obtención debe mantenerse tibio (30°C) antes de la dilución, para evitar el choque térmico por frío. Esto se realiza colocando semen y diluyente en baño de agua que se mantiene a 30 °C. Se extrae una proporción de semen para la evaluación, y el resto puede mezclarse con tres o cuatro partes de diluyente a 30 °C. Se recomienda mantener el semen durante 30 minutos a esa temperatura, a fin de aumentar la acción antibiótica del diluyente (Hafez, E., 2000).

La tasa de dilución estará en función del número de espermatozoides móviles necesarios en cada dosis para obtener máximo grado de fecundidad (Villena, E., 2002).

2.8. Refrigeración

La mezcla se enfría gradualmente hasta 5 °C, el enfriamiento debe ser lento, tomando por lo menos 1 hora para llevar la mezcla de 30 a 5 °C. Este proceso suele realizarse protegiendo el recipiente con una camisa de agua para evitar el choque de frío (Hafez, E., 2000).

Durante el descenso de 37 °C a 2 – 5 °C, puede producirse el choque por frío, que se traduce en una serie de alteraciones de la superficie de los espermatozoides acompañada de pérdidas irreversibles de la motilidad, actividad metabólica y capacidad de fecundación. Este problema puede ser evitado por enfriamiento gradual, de unos 5 °C, cada diez minutos entre 37° y 22 °C (Villena, E., 2002).

2.9. Conservación

El congelamiento demasiado rápido puede causar choque térmico y la formación de hielo intracelular. Si se realiza lentamente, las concentraciones de sal aumentan a medida que el agua se congela. Este incremento en la presión osmótica durante un periodo prolongado de congelamiento puede dañar las proteínas y lipoproteínas de las células espermáticas y el acrosoma (Hafez, E., 2000).

La congelación profunda permite una conservación indefinida. Los problemas de esta técnica se derivan de la progresiva concentración electrolítica citoplasmática (aumenta la concentración de productos de desecho) y aumento de la presión osmótica con la consiguiente pérdida del vigor del espermatozoide y destrucción celular por la formación de hielo durante el descenso térmico.

La zona crítica se encuentra entre los -5 y -25 °C, ya que existe peligro de cristalización y por tanto muerte de todos los espermatozoides (Villena, E., 2002).

2.10. Evaluación post descongelado

Después de descongelarse, los espermatozoides no sobreviven tanto como los que no han sido congelados, y no resisten bien un segundo descongelamiento (Illera, M., 1994).

El calentamiento rápido limita la formación de cristales de hielo en las células congeladas y a menudo el resultado es la supervivencia. (Hafez, E., 2000).

El daño a la membrana puede no ser completamente expresado inmediatamente después de la descongelación. Por ello el semen debe ser incubado a 37 °C durante 2 horas. Esta evaluación es conocida como prueba de termo resistencia o de incubación (Catena, M., et al., 1999).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Animales de estudio

Fueron dos llamas machos de tres y cuatro años de edad, bulbourectomizados, del tipo q'ara y una hembra de tres años, adquiridos de la localidad de Palcoco, provincia Los Andes del departamento de La Paz.

3.1.2. Materiales para la colección del eyaculado

- Vagina artificial, modificada
- Fundas de látex, tipo piel
- Fundas de polietileno
- Tubos colectores de 3 ml
- Termos de agua
- Termómetros
- Cubierta de toalla
- Sujetadores de látex
- Cajas de tecnopor

3.1.3. Materiales y equipos para la evaluación del eyaculado

- Baño maría
- Microscopio
- Tubos de ensayo
- Porta objetos
- Cubre objetos

- Cámara de Neubauer
- Papel pH metro (tornasol)
- Contador automático
- Pipetas pasteur
- Micropipetas de 50 y 100 μ l
- Eosina y nigrosina
- Solución fisiológica

3.1.4. Materiales y equipos para la dilución, refrigeración y conservación del eyaculado

- Cámara de flujo laminar
- Estufa de cultivo
- Cámara de refrigeración
- Termo criogénico
- Autoclave
- Termómetros
- Holders
- Baño maría
- Refrigerador
- Balanza digital de 0.0001 g
- Tubos de ensayo
- Pajuelas de polivinilo de 0.5 ml
- Nitrocelulosa de 0.22 μ m
- Marcador de vidrio
- Placas petri
- Vasos de precipitado de 50 ml

- Matraces de vidrio de 100 ml
- Pipeta graduada
- Pinzas para pajuelas
- Tris (Hidroximetil aminometano)
- PBS (buffer fosfato salino)
- Dulbecco's (SIGMA D-7777)
- Yema de huevo
- Antibióticos
- Suero sanguíneo de llama
- Glicerina
- Nitrógeno líquido
- Alcohol polivinílico
- Agua desionizada °HPLC

3.2. Método

3.2.1. Lugar de estudio

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Mejoramiento Genético y Diagnóstico Clínico del Servicio Departamental Agropecuario (SEDAG) de la Prefectura del departamento de La Paz, ubicada en Kallutaca, provincia Los Andes a 17 km de la ciudad de La Paz.

3.2.2. Preselección de animales

Antes de la adquisición, se realizó un examen clínico de los órganos genitales externos: testículos, adherencia pene prepucial, por inspección y palpación, en la feria de llamas de la localidad de Palcoco.

Los animales preseleccionados fueron 10 machos adultos, entre tres, cuatro y cinco años de edad, clínicamente sanos que fueron trasladados a la Unidad Académica Campesina de Tiahuanaco para la intervención quirúrgica de las glándulas bulbouretrales y ser reestablecidos (Copa, S., et al., 2001).

La llama hembra de la misma forma fue seleccionada y esta estuvo en edad reproductiva (tres años), clínicamente sana y vacía.

3.2.3. Adiestramiento de los animales

Los machos preseleccionados fueron trasladados a las instalaciones del laboratorio de mejoramiento genético de Kallutaca, donde fueron adiestrados hasta conseguir la docilidad y adaptación al método de colección y vagina artificial modificada.

El adiestramiento a la colección, se realizó en pavimento rígido del patio del laboratorio y en presencia del personal de apoyo.

La hembra se mantuvo separada de los machos para evitar la ausencia de la libido en los machos por el efecto del contacto con la hembra.

3.2.4. Selección de los animales de estudio

En la etapa preliminar del presente estudio, se observaron los resultados de la totalidad de machos en estudio, se seleccionaron a 2 animales, quienes mostraban buenas características macroscópicas y microscópicas, en la evaluación de su eyaculado.

3.2.5. Colección del eyaculado

El método de obtención del eyaculado fue por colección directa con vagina artificial modificada, descrito por Delgado, P. et al., (2000-2003).

Terminada la cópula, al cabo de 15 minutos, se colectó el eyaculado en un tubo cónico, este fue conservado en un termo mantenido en baño maría a 35 °C y llevado inmediatamente al laboratorio, para su evaluación macro-microscópica y posterior procesamiento para el congelado.

3.2.6. Evaluación del eyaculado

3.2.6.1. Características macroscópicas

3.2.6.1.1. pH

Por el volumen obtenido, se utilizó tiras reactivas, extrayendo una alícuota de eyaculado con una micropipeta, con punta (tip) estéril para luego verter en un trozo de cinta tornasol y de esta forma leer el valor de pH del eyaculado.

3.2.6.1.2. Viscosidad

La evaluación de la viscosidad fue de forma directa, observando el trayecto y la fluidez del eyaculado, dentro del tubo colector.

3.2.6.1.3. Volumen

El volumen se midió a través de la lectura de las graduaciones que tiene el tubo colector cónico, luego de que el eyaculado existente en las paredes de la funda de polietileno descienda completamente.

3.2.6.1.4. Color

La evaluación del color del eyaculado se realizó de forma directa en el tubo colector, tomándose en cuenta las tonalidades básicas del blanco, como el: blanco cremoso, blanco lechoso y blanco cristalino.

3.2.6.2. Características microscópicas

3.2.6.2.1. Motilidad espermática

La valoración de la motilidad se realizó con la ayuda del microscopio de la forma siguiente:

- Se atemperó el porta y cubre objetos a 38 °C aproximadamente.
- Con una micropipeta se tomó una alícuota de muestra del eyaculado, para depositarlo en un portaobjetos y posteriormente se cubrió con un cubreobjetos.
- La muestra se evaluó en el microscopio a un aumento de 40x.
- Se contaron los espermatozoides en movimiento y se obtuvo el porcentaje de espermatozoides móviles con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Mot.} = \frac{n}{N} \times 100$$

n = Número de espermatozoides móviles

N = Número de espermatozoides contados

- La valoración de motilidad de los espermatozoides en el eyaculado se realizó según la descripción de Evans, G. y Maxwell, W., (1990).

Cuadro 2 Sistema de valoración de la onda de movimiento del semen

| Valor | Clase | Descripción |
|-------|-----------|---|
| 5 | Muy buena | Densa, ondas de movimiento. No se pueden observar espermios individuales. El 90% o más de estos están activos. |
| 4 | Buena | Movimiento vigoroso, pero las ondas y remolinos no son tan rápidos como los de valor 5. Alrededor de 70 – 85% de células activas. |
| 3 | Regular | Sólo aparecen ondas de movimiento lento. Se observan espermatozoides aislados. 45 – 65% de células activas. |
| 2 | Pobre | No aparecen ondas pero si movimientos de espermatozoides. Sólo viven el 20 – 40% de las células y su movilidad es pobre. |
| 1 | Muy pobre | Muy pocos espermatozoides (alrededor de 10%), presentan signos de vida aunque con movimientos débiles. |
| 0 | Muertos | Ningún espermatozoide presenta movimiento. |

Fuente: Evans, G. y Maxwell, W., (1990)

3.2.6.2.2. Concentración espermática

La concentración espermática se midió, en una dilución de 1:100, con la ayuda de una cámara Neubauer de la siguiente forma:

- Se tomaron con la micropipeta 990 μ l de solución fisiológica y se depositó en un tubo de ensayo.
- Seguidamente se cambió la punta o tip y se tomaron con la micropipeta 10 μ l de eyaculado desde el tubo colector y se depositó en el tubo de ensayo, que contenía la solución fisiológica.

- Se homogenizó esta solución, con movimientos de rotación y mezclados suavemente para evitar daños mecánicos a los espermatozoides.
- Se tomaron 20 μ l de la mezcla con la micropipeta y se depositaron en la cámara Neubauer y se dejó en reposo 3 minutos.
- Para el recuento de espermatozoides se tomaron los cuatro cuadrantes del campo A y B de la cámara.
- La media de células espermáticas se multiplicó por el factor 1000000, dando como resultado el número de espermatozoides por ml.

3.2.6.2.3. Vitalidad espermática

El porcentaje de espermatozoides vivos y muertos se determinó por la técnica descrita por Derivaux, J., (1982), donde el colorante se preparó con:

| | |
|--------------------|---------|
| Eosina B | 0,1 g |
| Nigrosina | 0,5 g |
| Agua destilada csp | 10,0 ml |

- Sobre un portaobjetos, previamente calentado aproximadamente a 35 °C, se puso una alícuota del eyaculado y mezclado suavemente con otra alícuota del colorante, (v:v) (1:1).
- Una gota de la mezcla se colocó en un extremo del portaobjetos y se expandió con el extremo de otro portaobjetos y se fijó a temperatura de 37 °C aproximadamente.

- Secado el frotis se realizó el conteo con la ayuda de un microscopio, observando a 40x y determinando el porcentaje de vivos y muertos con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Vit.} = \frac{n}{N} \times 100$$

n = Número de espermatozoides móviles

N = Número de espermatozoides contados

3.2.7. Dilutores

3.2.7.1. Esterilización de materiales y reactivos

Antes de la preparación de los dilutores se esterilizaron los materiales de la siguiente forma:

- Los materiales de vidrio se lavaron con detergente, enjuagados con agua destilada, secados a temperatura ambiente, cubiertos con papel madera y esterilizados en autoclave por 15 minutos, a 1.5 atmósferas de presión y 120 °C.
- De la misma forma se sometió al autoclave: El agua desionizada °HPLC y la nitrocelulosa de 0.22 µm, montada en el "holder" por un tiempo de 15 min a 120 atmósferas de presión.

- El material de plástico y otros materiales no autoclavables, se lavaron con detergente, enjuagados con agua destilada, secados a temperatura ambiente y sometidos a los rayos UV de la cámara de flujo laminar por un tiempo de 15 minutos.
- Los componentes que formaron parte de los diluyentes, como la yema de huevo, suero sanguíneo de llama y glicerina se sometieron a irradiación con rayos UV, de la cámara de flujo laminar, por un tiempo de 15 minutos.

3.2.7.2. Preparación del TRIS

La preparación del Tris (1), fue de acuerdo a la fórmula descrita por Evans, G. y Maxwell, W., (1987).

Cuadro 3 Componentes del Tris

| COMPONENTE | CANTIDAD |
|--|-----------|
| Tris (Hidroximetil aminometano) CHNO_3 | 3,028 g |
| Acido cítrico -1-Hidratado $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 1,678 g |
| Glucosa (D-glucosa dextrosa) | |
| O. $(\text{CH OH})_4 \text{ CH} \cdot \text{CH}_2\text{OH}$ | 1,000 g |
| Penicilina | 100,00 UI |
| Estreptomina | 0,100 g |
| Agua desionizada °HPLC csp | 100,00 ml |

Fuente: Evans, G. y Maxwell, W. (1987).

3.2.7.3. Preparación del PBS

La preparación del PBS (2), fue de acuerdo a la fórmula descrita por Hafez, E., (1987).

Cuadro 4 Componentes del PBS

| COMPONENTE | CANTIDAD |
|-------------------------------------|------------|
| Fracción A | g/l |
| NaCl | 8,000 |
| KCl | 0,200 |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 0,100 |
| MgCl ₂ 6H ₂ O | 0,100 |
| Fracción B | g/l |
| Na ₂ HPO ₄ | 1,115 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,200 |
| Piruvato de Na | 0,036 |
| Glucosa | 1,000 |
| Antibióticos | /l |
| Penicilina G Sódica | 100,00 UI |
| Sulfato de estreptomicina | 50,00 mg |

Fuente: Hafez, E., (1987).

Este se preparó disolviendo las fracciones A y B por separado en el 50% del total de agua destilada, estas dos fracciones se mezclaron al momento de la dilución del eyaculado.

3.2.7.4. Preparación del DULBECCO's

El dilutor Dulbecco's SIGMA (3), es un medio de cultivo para células, de uso instantáneo y con la proporción de uso de 13.50 g/l.

3.2.7.5. Dilución del eyaculado

Los dilutores previamente preparados, fueron sometidos a la esterilización mecánica, estos fueron micro filtrados a través de miliporo de 0.22 µm, montadas en un holder dentro de la campana de flujo laminar.

Posteriormente se prepararon los dilutores, según los porcentajes propuestos, mas la adición de los componentes protocolares, como son la yema de huevo y glicerina, separados en dos fracciones: A, sin glicerina y B, con glicerina en los siguientes porcentajes:

Cuadro 5 Niveles protocolares de dilución

| Tratamiento | Niveles | Tris % | Suero % | Yema % | Glicerina % |
|-------------|---------|--------------|---------|--------|-------------|
| A | 1 | 64 | 15 | 15 | 6 |
| | 2 | 54 | 20 | 20 | 6 |
| | 3 | 44 | 35 | 15 | 6 |
| | | PBS % | Suero % | Yema % | Glicerina % |
| B | 1 | 64 | 15 | 15 | 6 |
| | 2 | 54 | 20 | 20 | 6 |
| | 3 | 44 | 35 | 15 | 6 |
| | | Dulbecco's % | Suero % | Yema % | Glicerina % |
| C | 1 | 64 | 15 | 15 | 6 |
| | 2 | 54 | 20 | 20 | 6 |
| | 3 | 44 | 35 | 15 | 6 |

3.2.7.5.1. Primera dilución

Para estabilizar las temperaturas tanto del eyaculado como la fracción A del dilutor, ambos se mantuvieron dentro la estufa de cultivo en baño maría a 30 °C.

El eyaculado se mezcló con la fracción A, sin glicerina, vertiendo lentamente por las paredes del tubo colector, para evitar el estrés de los espermatozoides producido por el contacto del dilutor.. Esta primera dilución se realizó con el 50% del volumen total final.

Posterior a la primera dilución se desconectó la energía eléctrica de la estufa para que la temperatura de éste descienda lentamente, junto con la dilución del eyaculado, hasta una temperatura ambiente.

3.2.8. Refrigeración

El diluido pasó a la cámara de refrigeración, a temperatura ambiente de 35 °C y se enfrió durante 2 horas de forma descendiente, lentamente hasta llegar a los 4 °C, donde permaneció 2 horas.

3.2.8.1.1. Segunda dilución

Durante la permanencia del diluido, en la cámara de refrigeración, se realizó la segunda dilución con la fracción B, con glicerina.

Esta se hizo vertiendo lentamente por las paredes del tubo colector para evitar el cambio brusco producido por el glicerol, a una temperatura de 4 °C en cuatro etapas, cada una con intervalos de 15 a 20 minutos.

3.2.8.1.2. Empajillado

Antes del empajillado, culminada la etapa de refrigeración, se comprobó la motilidad y vitalidad espermática. Luego con la ayuda de una pro pipeta y una pipeta Pasteur estéril, se tomó una alícuota del eyaculado diluido, se empajilló de forma manual en pajuelas medianas de polivinilo de 0.5 ml, llenándolas completamente y dejando una burbuja de aire.

3.2.8.1.3. Sellado

El sellado con alcohol polivinílico se realizó de la siguiente manera:

- Se preparó el polvo en una caja petri
- Se compactó la superficie, del polvo, con la tapa de la caja petri

- Se colocó el conjunto, pajuelas y polvo, a 4 °C, al practicar esta forma de llenado,
- Se introdujo repetidamente el conjunto de pajuelas sobre el polvo sellador, evitando el contacto a las pajuelas con la mano, hasta que abarque aproximadamente 1/3 de la burbuja de aire.
- Una vez llenadas con el polvo y retirado el excedente de polvo, se sumergió verticalmente en agua a 4 °C, hasta que el alcohol polivinílico este hidratado y selle completamente este extremo de la pajuela.

3.2.8.1.4. Marcado

Verificado el buen llenado y sellado del tapón, se secó el extremo húmedo de la pajuela e identificó con un marcador de vidrio cada una de las pajuelas procesadas de acuerdo a sus características de tratamiento, para ser colocados en el "rack" o porta pajuelas.

3.2.9. Conservación

La conservación se realizó manualmente, en una caja de tecnopor, en un nivel de nitrógeno líquido fijo, medidos cada una de las distancias de acuerdo a la temperatura presentada en dicha caja.

La curva de congelamiento a la que se sometieron las pajuelas fue descrita por Decuadro-Hansen., (1997), cuyo eyaculado después de ser enfriado a 4 °C, pasó al borde del recipiente conteniendo nitrógeno líquido. Posteriormente se descendió desde los 4 °C hasta -10 °C en un tiempo de tres minutos, desde donde se llegó al nitrógeno líquido en un tiempo de 4 minutos y 30 segundos, haciendo un total de 7 minutos y 30 segundos. Luego las pajuelas congeladas pasaron al termo de nitrógeno líquido, anexo 1.

3.2.10. Evaluación post descongelado

Esta evaluación se realizó inmediatamente concluido el proceso de congelación y dos semanas después de haber procesado el eyaculado.

Las pajuelas, se descongelaron en baño maría a 35 °C por 30 segundos.

De estas se evaluaron la motilidad y vitalidad con el mismo método de valoración practicada en el momento de la colecta, calificados con los rangos de motilidad y vitalidad descritos por Derivaux, J., (1982) y Evans, G. y Maxwell, W., (1990).

3.3. Factores en estudio

Dilutores

- Dulbecco's
- PBS
- Tris

Niveles protocolares de dilutores más componentes

- Dilutor 64%; Suero sanguíneo de llama 15%; Yema de huevo 15%; Glicerina 6%
- Dilutor 54%; Suero sanguíneo de llama 20%; Yema de huevo 20%; Glicerina 6%
- Dilutor 44%; Suero sanguíneo de llama 35%; Yema de huevo 15%; Glicerina 6%

Etapas de Evaluación

- Colección
- Refrigeración
- Descongelación, inmediata al crioconservado
- A dos semanas, descongelado después de crioconservado

3.4. Variables de respuesta

- Motilidad espermática (%)
- Vitalidad espermática (%)

3.5. Análisis estadístico

Para determinar el efecto de los tres dilutores, presentes en tres niveles protocolares en cuatro etapas de evaluación, los resultados fueron analizados empleando el siguiente Modelo Aditivo Lineal, descrito por Calzada Benza, (1990):

$$\gamma_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \lambda_k + \alpha\lambda_{ik} + \beta\lambda_{jk} + \alpha\beta\lambda_{ijk} + \epsilon_n(ijk)$$

| | |
|----------------------------|---|
| γ_{ijk} | = Observación de la motilidad y viltalidad experimental |
| μ | = Media general |
| α_i | = Efecto del i-ésimo Dilutor |
| β_j | = Efecto del j-ésimo Nivel |
| $\alpha\beta_{ij}$ | = Efecto de la interacción del i-ésimo Dilutor por el j-ésimo Nivel |
| λ_k | = Efecto de la k-ésima etapa de evaluación |
| $\alpha\lambda_{ik}$ | = Efecto de la interacción de i-ésimo Dilutor por la k-ésima etapa de evaluación |
| $\beta\lambda_{jk}$ | = Efecto de la interacción del j-ésimo Nivel por la k-ésima etapa de evaluación |
| $\alpha\beta\lambda_{ijk}$ | = Efecto de la triple interacción del i-ésimo Dilutor por el j-ésimo Nivel y la k-ésima etapa de evaluación |
| $\epsilon_n(ijk)$ | = Error experimental |

| | | |
|--------|----------------------------|----------------------|
| Donde: | $i = 1, 2 \text{ y } 3$ | Dilutores |
| | $j = 1, 2 \text{ y } 3$ | Niveles protocolares |
| | $k = 1, 2, 3 \text{ y } 4$ | Etapas de evaluación |

Las diferencias estadísticamente significativas, se analizaron según la prueba de comparación múltiple de DUNCAN, a un nivel de significancia del 0.05.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Descripción del Eyaculado en la etapa de Colección

Cuadro 6 Características macro-microscópicas del eyaculado de llama bulbourectomizado, en la etapa de colección

| Macroscópicas | Promedio | SD ± | C.V. % | Extremos | |
|---------------------------------------|-----------------|-------------|---------------|-----------------|-------|
| Color | Blanco opaco | | | | |
| Viscosidad | 0.00 | 0.00 | | | |
| pH | 7.33 | 0.29 | 3.96 | 7.50 | 7.00 |
| Volumen (ml) | 1.70 | 0.10 | 5.88 | 1.80 | 1.60 |
| Microscópicas | | | | | |
| Concentración ($\times 10^6$ epz/ml) | 75.33 | 4.51 | 5.99 | 80.00 | 71.00 |
| Motilidad (%) | 64.00 | 2.00 | 3.13 | 66.00 | 62.00 |
| Vitalidad (%) | 73.00 | 2.00 | 2.74 | 75.00 | 71.00 |

Sobre las características macroscópicas de los eyaculados de llama bulbourectomizado, obtenidos a la colección, se tuvo un volumen promedio de 1.70 ± 0.10 ml, de color blanco opaco, con un pH promedio de 7.33 ± 0.29 .

La obtención de un eyaculado fluido de grado de viscosidad 0 con una distribución homogénea de espermatozoides suspendidos, se atribuye a la extirpación quirúrgica de las glándulas bulbouretrales (Gonzales, V., 2003), las que le daban un aspecto viscoso semejante a un gel (Quispe, F., 1987; Achata, R., 1989; Bravo, P.W., 1998) debido a las secreciones producidas por dicha glándula (Laruta, D., 2002).

4.2. Motilidad espermática por el efecto de dilutores y niveles protocolares en el proceso de crioconservación

Cuadro 7 ANVA para motilidad espermática por el efecto de dilutores y niveles protocolares en el proceso de crioconservación

| F.V. | G.L. | S.C. | C.M. | F Cal | Pr > F |
|------------------|-----------|-----------------|----------|---------|-----------|
| Dilutor | 2 | 713.72 | 356.86 | 115.93 | <.0001 ** |
| Niveles | 2 | 48.24 | 24.12 | 7.84 | 0.0021 ** |
| Dil * Niv | 4 | 17.91 | 4.48 | 1.45 | 0.2435 NS |
| Evaluación | 2 | 20518.44 | 10259.22 | 3332.92 | <.0001 ** |
| Dil * Eval | 4 | 145.30 | 36.33 | 11.80 | <.0001 ** |
| Niv * Eval | 4 | 19.87 | 4.97 | 1.61 | 0.1995 NS |
| Dil * Niv * Eval | 8 | 36.11 | 3.08 | 1.47 | 0.2156 NS |
| Error | 27 | 83.11 | | | |
| TOTAL | 53 | 21582.70 | | | |

C.V. 6.69%

Según el ANVA para motilidad espermática, cuadro 7, presenta diferencias altamente significativas para los factores Dilutor, Niveles protocolares, Evaluación y para la interacción Dilutor por Evaluación, con un promedio general de 26.23%, desviación estándar de 1.75 y un coeficiente de variación de 6.69%, que demuestra la confiabilidad de los datos.

Los datos obtenidos para motilidad espermática, rechazan la hipótesis nula para los factores Dilutores, Niveles protocolares y Etapas de evaluación, ya que estos presentan diferencias altamente significativas ($P \leq 0.05$).

4.2.1. Motilidad espermática por el efecto de tres Dilutores

Cuadro 8 Promedios de motilidad espermática del eyaculado por el efecto de tres dilutores (%)

| Dilutor | Promedio | SD ± | SDR | Extremos | |
|------------|----------|--------|------|----------|-------|
| Dulbecco's | 29.85 | 18.235 | 0.61 | 58.50 | 14.00 |
| PBS | 21.26 | 22.271 | 1.05 | 54.50 | 4.30 |
| Tris | 27.57 | 19.977 | 0.72 | 57.50 | 10.00 |

La motilidad espermática por el efecto del factor dilutor fue: 29.85, 21.26 y 27.27% para Dulbecco's, PBS y Tris, respectivamente, cuyos valores extremos son muy dispersos, que incrementan los valores de la desviación estándar y desviación estándar relativa, cuadro 8.

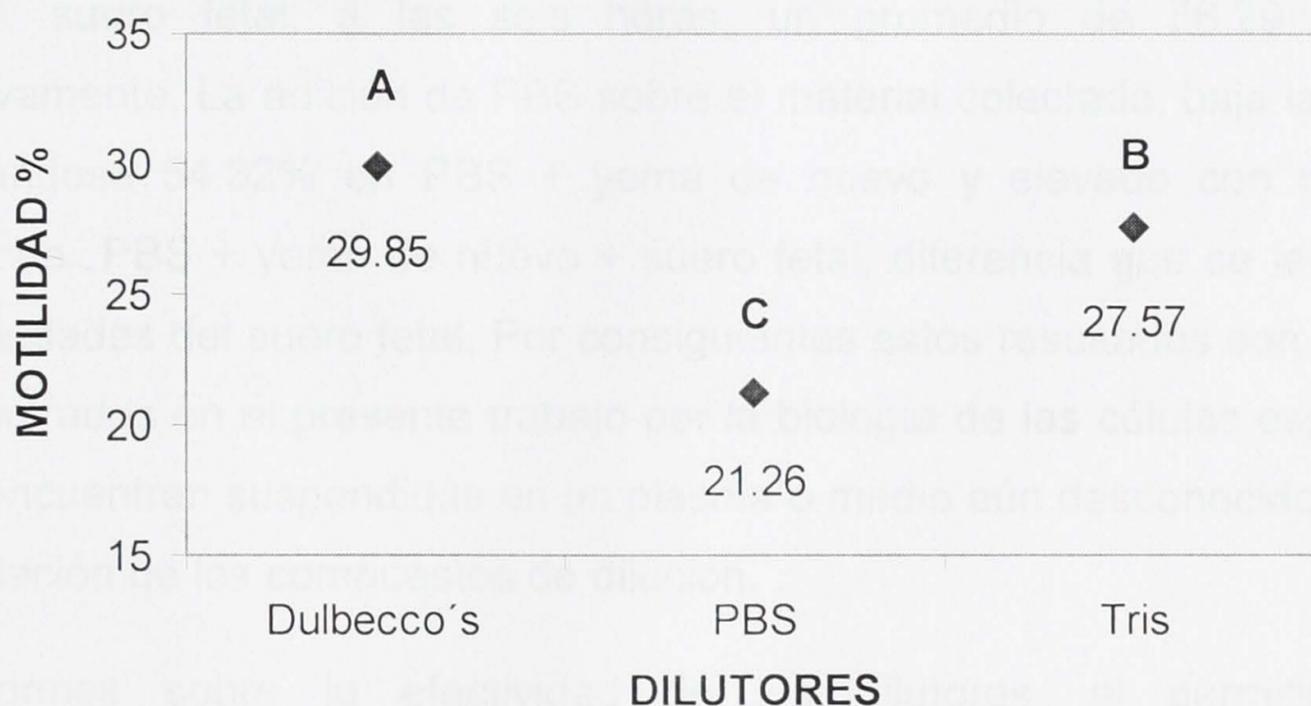


Gráfico 1 Porcentaje de motilidad espermática del eyaculado por el efecto de tres dilutores

El gráfico 1, muestra los promedios generales, de motilidad espermática, obtenidos por efecto de someter al eyaculado a tres dilutores para la críoconservación.

Durante el experimento, según la prueba de Duncan, muestra que el medio de cultivo celular Dulbecco`s, permite mayor motilidad espermática con 29.85%, seguido por el dilutor Tris con 27.57% y por último el dilutor PBS con 21.26%.

Los mejores diluyentes para semen, se caracterizan por cumplir con las condiciones de osmolaridad ya que incluyen sustancias tampones como el citrato, acetato, etc. También por poseer concentraciones precisas de Na, K y Mg y quelantes como aminoácidos glutamina y glicina, entre otros. El medio de cultivo celular Dulbecco`s cuenta con un número mayor de componentes, razón por el que probablemente mantuvo mejor la motilidad durante el experimento, anexo 10.

Quintano, J., (2001), muestra la motilidad de espermatozoides de alpacas, colectados del conducto deferente sobre Tris + yema de huevo y Tris + yema de huevo + suero fetal, a las seis horas, un promedio de 56.29 y 58.31% respectivamente. La adición de PBS sobre el material colectado, baja la motilidad, encontrándose 54.32% en PBS + yema de huevo y elevado con 62.15% en solución de PBS + yema de huevo + suero fetal, diferencia que se le atribuye a las propiedades del suero fetal. Por consiguientes estos resultados son mayores a los encontrados en el presente trabajo por la biología de las células espermáticas que se encuentran suspendidas en un plasma o medio aún desconocido como son la formulación de los compuestos de dilución.

Los informes sobre la efectividad de los dilutores, al permitir superior supervivencia y fertilidad en otros diluyentes, muestran las posibles interacciones con los cambios de volumen en el proceso de crioconservación del semen al congelar y descongelar, por lo que desde todo punto de vista es muy difícil generalizar la causa a un solo factor, por que un diluyente satisfactorio para un animal o para una serie de condiciones puede no ser aceptable para otros. Salisbury, G.W., (1982).

4.2.2. Motilidad espermática por el efecto de tres Niveles protocolares

Cuadro 9 Promedios de motilidad espermática del eyaculado por el efecto de tres niveles protocolares (%)

| Nivel | Promedio | SD ± | SDR | Extremos | |
|---------|----------|-------|------|----------|------|
| Nivel 1 | 26.71 | 20.02 | 0.75 | 58.50 | 5.00 |
| Nivel 2 | 27.07 | 20.37 | 0.75 | 57.50 | 5.00 |
| Nivel 3 | 24.91 | 21.24 | 0.85 | 55.50 | 4.30 |

Los porcentajes del promedio de motilidad espermática por el efecto de los niveles protocolares fue: 26.71, 27.07 y 24.91% para Nivel 1, Nivel 2 y Nivel 3 respectivamente, así mismo, se observa valores extremos muy dispersos, a causa de las motilidades muy bajas observadas la descongelaado, razón por el que los valores de la desviación estándar y desviación estándar relativa, no muestran confiabilidad de sus valores, cuadro 9.

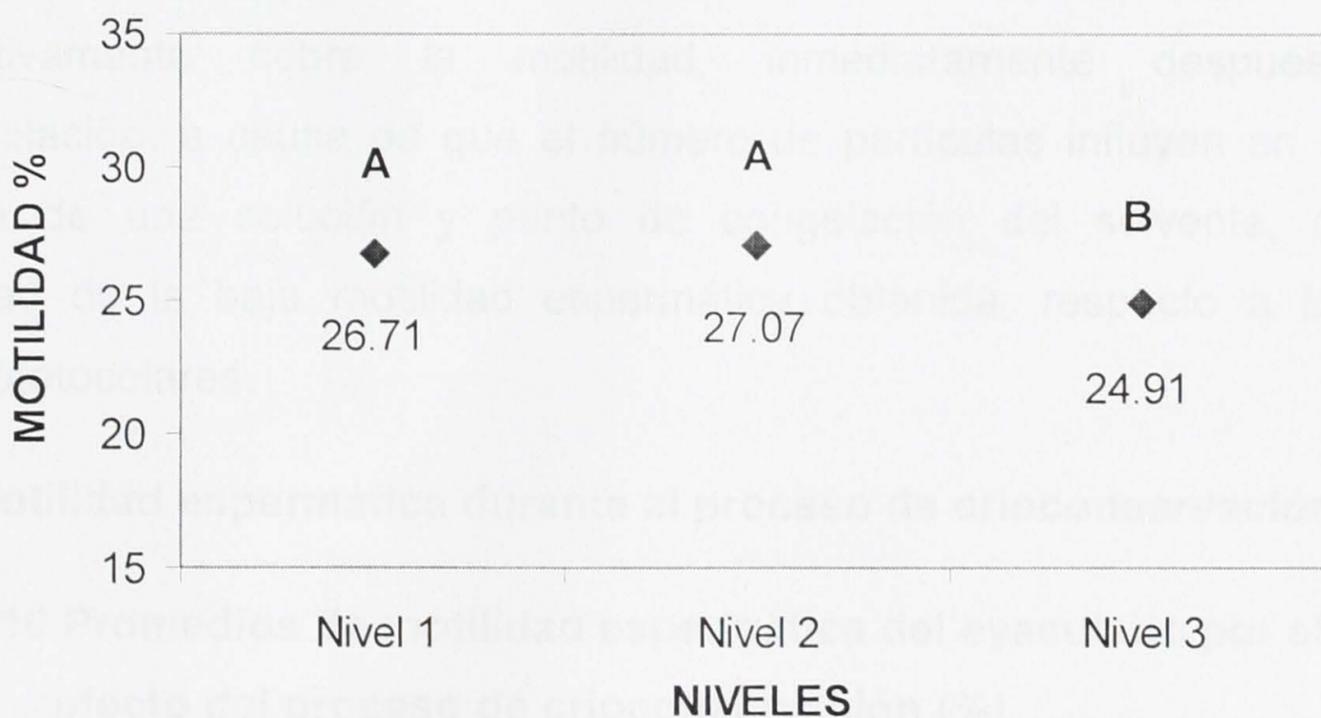


Gráfico 2 Porcentaje de motilidad espermática del eyaculado por el efecto de tres niveles protocolares

El gráfico 2 muestra los promedios de motilidad espermática que se obtuvieron al someter el eyaculado a niveles protocolares, durante el proceso de crioconservación.

Según la prueba de Duncan, los niveles 1 y 2, proporcionaron mayor motilidad espermática con promedios de 26.71 y 27.07%, no habiendo diferencias significativas entre ambos, cuyas proporciones protocolares fueron: Dilutor 64%; Suero de llama 15%; Yema de huevo 15%; Glicerina 6% y Dilutor 54%; Suero de llama 20%; Yema de huevo 20%; Glicerina 6%, respectivamente, siendo los anteriores significativamente superiores al Nivel 3 promedio de motilidad espermática de 24.91% cuya proporción protocolar fue: Dilutor 44%; Suero de llama 35%; Yema de huevo 15%; Glicerina 6%.

Respecto a la relativa inferioridad de motilidad espermática del Nivel protocolar 3, Salisbury, G.W., (1982), indica que los niveles de dilución inferiores afectan significativamente sobre la motilidad, inmediatamente después de la descongelación, a causa de que el número de partículas influyen en la presión osmótica de una solución y punto de congelación del solvente, de ahí la posibilidad de la baja motilidad espermática obtenida, respecto a los demás Niveles protocolares.

4.2.3. Motilidad espermática durante el proceso de crioconservación

Cuadro 10 Promedios de motilidad espermática del eyaculado por el efecto del proceso de crioconservación (%)

| Evaluaciones | Promedio | SD ± | SDR | Extremos | |
|---------------------|-----------------|-------------|------------|-----------------|-------|
| Refrigerado | 53.79 | 2.585 | 0.048 | 58.50 | 49.50 |
| Descongelado | 12.86 | 5.488 | 0.427 | 20.30 | 4.50 |
| A 2 semanas | 12.03 | 5.080 | 0.422 | 18.50 | 4.30 |

La motilidad espermática durante el proceso de crioconservación tuvo variaciones, así que se tuvo una motilidad espermática de 53.79% en la etapa de refrigeración, con una desviación estándar de ± 2.585 y una desviación estándar relativa de 0.048 que le da confiabilidad a los valores obtenidos en esta primera etapa. Posterior al refrigerado, se obtuvo una motilidad espermática de 12.86%, en el descongelado y una desviación estándar de ± 5.488 , con alto rango en los valores extremos. De la misma forma a las 2 semanas del proceso de crioconservación, se obtuvo un promedio de 12.03% con una desviación estándar de ± 5.080 , valores que demuestran ser no confiables a causa del alto rango registrado en los valores extremos de ambas etapas, cuadro 10.

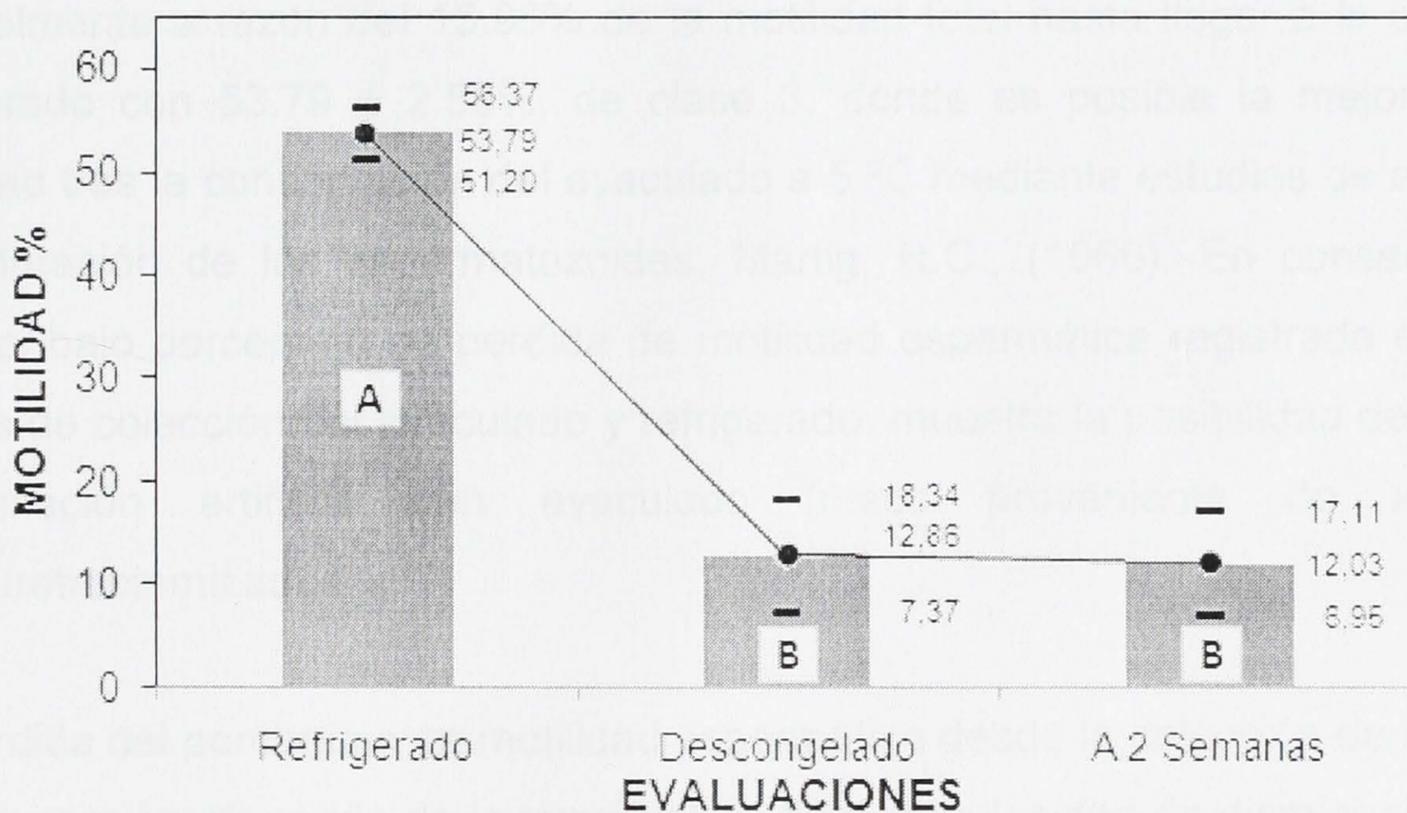


Gráfico 3 Porcentaje de motilidad espermática del eyaculado por el efecto del proceso de crioconservación

El gráfico 3 muestra los promedios de motilidad espermática obtenidos por el efecto de someter el eyaculado al proceso de crioconservación.

A la prueba de Duncan, se observa un porcentaje de motilidad espermática en la etapa de refrigerado de $53.79 \pm 2.58\%$, superior a las etapas de descongelado y a 2 semanas del proceso de crioconservación, con promedios de $12.86 \pm 5.48\%$ y $12.03 \pm 5.08\%$ de motilidad espermática, respectivamente, no habiendo diferencias significativas entre estas dos últimas etapas.

Inicialmente, en la colección del eyaculado, se tuvo una motilidad espermática de $64.00 \pm 2.00\%$, de clase 3, porcentaje de motilidad que fue descendiendo gradualmente a razón del 15.95% de la motilidad total hasta llegar a la etapa de refrigerado con $53.79 \pm 2.58\%$, de clase 3, donde es posible la mejora de la fertilidad tras la conservación del eyaculado a 5°C mediante estudios de equilibrio y maduración de los espermatozoides, Martig, R.C., (1966). En consecuencia, dado el bajo porcentaje de pérdida de motilidad espermática registrada entre las etapas de colección del eyaculado y refrigerado, muestra la posibilidad de realizar inseminación artificial con eyaculado fresco proveniente de animales bulbourectomizados.

La pérdida del porcentaje de motilidad espermática desde la colección de semen a la refrigeración, depende de la temperatura final, la velocidad de disminución de la temperatura, de la relación de dilución e intervalo de tiempo en que los espermatozoides se hallan expuestos a la temperatura final de refrigeración. Choong, C.H., et al., (1962).

Posterior al refrigerado el paso del eyaculado por la congelación fue crucial, repercutiendo negativamente sobre la motilidad espermática, en la que se obtuvo $12.86 \pm 5.48\%$ de motilidad con clase 1, perdiendo el 79.90% de la motilidad total en la etapa de descongelado inmediato. Esta pérdida de motilidad total se atribuye a la curva de congelamiento empleada para la congelación de semen bovino descrito por Decuadro-Hansen, (1997), en el que probablemente haya ocurrido un choque de frío que conllevó al aumento de permeabilidad de la membrana del espermatozoide, ocasionando reducción marcada en la actividad respiratoria y por consiguiente pérdida irreversible de la motilidad, Choong, C.H., et al., (1962).

Posterior a las 2 semanas de haber congelado el eyaculado de llama bulbourectomizado, mostró definitivamente un porcentaje de motilidad de $12.03 \pm 5.08\%$ con clase de motilidad de 1, donde se perdió en definitiva el 81.20% de la motilidad total y que estadísticamente no difiere en forma significativa con los resultados de motilidad espermática de la etapa del descongelado inmediato al proceso de congelación, hecho que demostró nuevamente la influencia negativa de la curva de congelamiento sobre la motilidad espermática final, así como también, la necesidad de que este tipo de eyaculado obtenido de animales bulbourectomizados, requiere un tipo especial de tratamiento y/o curva de congelamiento en particular.

La motilidad antes del congelamiento, es decir del semen fresco, obtenido por Aller, et al., 2003, fue de $54.30 \pm 10.50\%$, ($p \leq 0.05$), similar a los encontrados en el presente trabajo con $53.79 \pm 2.58\%$ en la etapa de refrigerado, en cambio los resultados encontrados por Mendoza, C., (2000), fueron nulos a los 45 minutos de incubado en Tris y PBS, sobre la motilidad y vitalidad de espermatozoides de alpaca, los que son inferiores al presente trabajo.

Por otro lado, Cárdenas, N.M., (2002), en su trabajo de inseminación artificial con espermatozoides congelados colectados de los conductos deferentes en alpacas, encontró motilidades mayores al presente trabajo, $68.34 \pm 7.61\%$ en la etapa de refrigerado (antes de congelar) y $35.10 \pm 6.09\%$ de motilidad espermática al descongelado.

La motilidad encontrada, después del descongelado del eyaculado de llama bulbouretrectomizado, fue inferior a los reportados por Mc Evoy, et al., (1996); Valdivia, M., et al., (1999); Burgel, et al., (1999), obtenidos entre un 10 a 30% de motilidad. Así también la influencia de la criopreservación sobre la motilidad de espermatozoides de llama, después del descongelamiento, fue de 20.40 ± 7.50 , significativamente ($p \leq 0.05$), reportados por Aller, J.F., et al., (2003).

4.2.4. Interacción de Dilutores por Etapas de evaluación

Cuadro 11 ANVA del efecto de la interacción de Dilutores por Etapas de evaluación sobre la motilidad espermática del eyaculado (%)

| F.V. | G.L. | S.C. | C.M. | F Cal | Pr > F |
|---------------|------|---------|---------|---------|-----------|
| Ev (Dul) | 2 | 5592.50 | 2796.25 | 693.50 | <.0001 ** |
| Ev (PBS) | 2 | 8397.07 | 4198.54 | 1813.19 | <.0001 ** |
| Ev (Tris) | 2 | 6674.17 | 3337.08 | 454.94 | <.0001 ** |
| Dil (Ref) | 2 | 35.60 | 17.80 | 3.43 | 0.0595 NS |
| Dil (Des) | 2 | 443.00 | 221.50 | 48.19 | <.0001 ** |
| Dil (A 2 Sem) | 2 | 380.41 | 190.21 | 48.90 | <.0001 ** |

El cuadro 11 muestra el efecto de la interacción de dilutor por la etapa de evaluación sobre la motilidad espermática, en el que se observa diferencias altamente significativas ($P \leq 0.05$) entre las interacciones evaluaciones por los dilutores Dulbecco's, PBS y Tris, como también existen diferencias altamente

significativas ($P \leq 0.05$) entre dilutores por la etapas de evaluación: descongelado y a 2 semanas de crioconservado el eyaculado, no habiendo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre la interacción dilutor por la etapa de refrigeración.

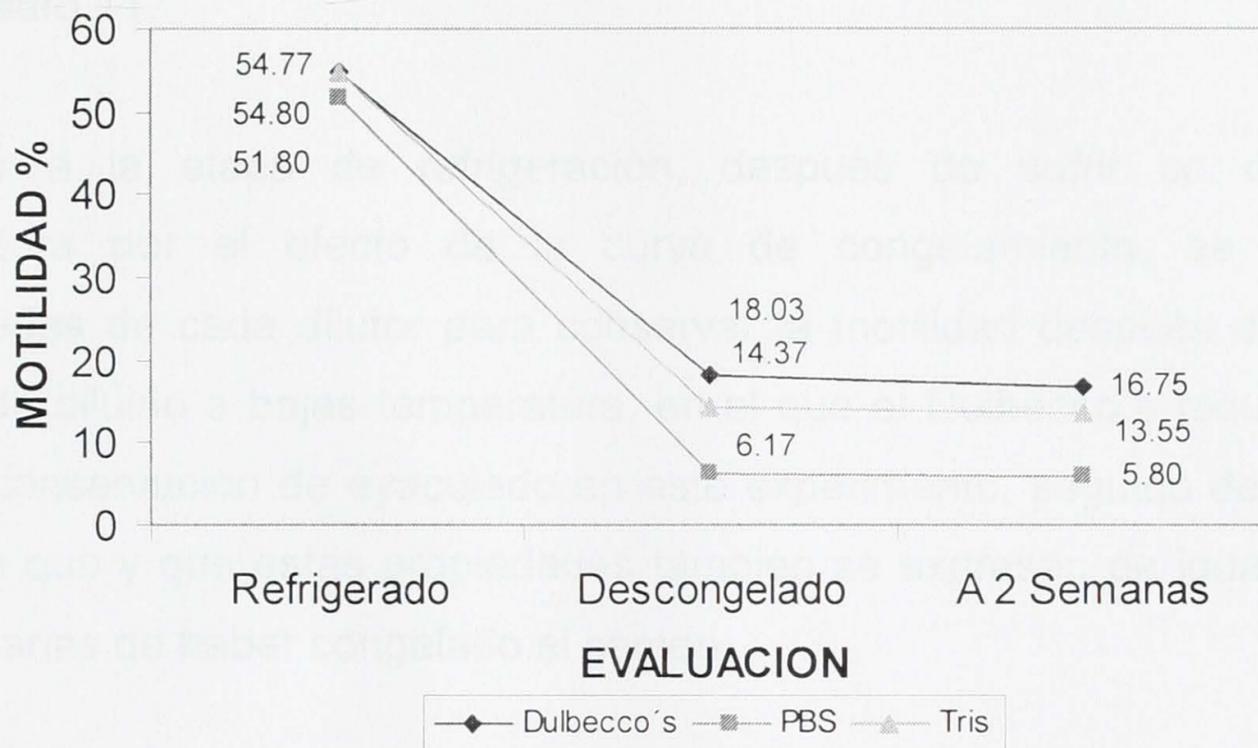


Gráfico 4 Efectos simples del porcentaje de motilidad espermática del eyaculado por el efecto de la interacción de Dilutores por Etapas de evaluación

El gráfico 4 muestra que con Dulbecco's se obtuvo mejores resultados de motilidad en la etapa del descongelado, con promedios de 18.03%, seguido del Tris y PBS con 14.37 y 6.17% respectivamente, después de haber sufrido los efectos de la curva de congelamiento. Posterior a ésta etapa, se mantuvo relativamente igual los promedios de motilidad espermática a dos semanas de haber congelado el eyaculado con 16.75% para el Dulbecco's, y 13.55, 5.80% para el Tris y PBS respectivamente.

Estadísticamente los tres dilutores mantuvieron con motilidad espermática en la etapa de refrigeración, posiblemente se deba a que éstos tienen una misma capacidad de mantener espermatozoides con motilidad a 4 °C, hecho que muestra lo no significancia ($P \leq 0.05$) en la interacción dilutores por refrigeración, mostrado en el cuadro 11.

Posterior a la etapa de refrigeración, después de sufrir un descenso de temperatura por el efecto de la curva de congelamiento, se observa las capacidades de cada dilutor para conservar la motilidad después de someter el eyaculado diluido a bajas temperatura, en el que el Dulbecco's resulto ser mejor para la conservación de eyaculado en este experimento, seguido del Tris y PBS, debido a que y que estas propiedades también se expresan de igual forma a las dos semanas de haber congelado el semen.

En la etapa de refrigeración, los espermatozoides suspendidos en cualquier dilutor, utilizado en el presente trabajo y antes de someter al proceso de congelamiento, son capaces de fertilizar el ovocito; así mismo son capaces de fertilizar sin haber hecho contacto con las secreciones de las glándulas accesorias, Sanz, E., et al., (2004).

La diferencia de motilidades al descongelado posiblemente se deba a que el punto de congelación de una solución depende de la concentración de las partículas que contiene el soluto. En un experimento, con espermatozoides de bovinos durante la congelación, la temperatura daña mas a los espermatozoides cuando el diluyente es hipotónico que cuando es isotónico, Salisbury, G., et al., (1982).

4.3. Vitalidad espermática por el efecto de dilutores y niveles protocolares en el proceso de crioconservación

Cuadro 12 ANVA para vitalidad espermática por el efecto de dilutores y niveles protocolares en el proceso de crioconservación

| F.V. | G.L. | S.C. | C.M. | F Cal | Pr > F |
|------------------|-----------|-----------------|----------|---------|-----------|
| Dilutor | 2 | 753.74 | 376.87 | 116.97 | <.0001 ** |
| Niveles | 2 | 40.34 | 20.17 | 6.26 | 0.0058 ** |
| Dil * Niv | 4 | 22.86 | 5.72 | 1.77 | 0.1633 NS |
| Evaluación | 2 | 27818.59 | 13909.29 | 4317.17 | <.0001 ** |
| Dil * Eval | 4 | 103.85 | 25.96 | 8.06 | 0.0002 ** |
| Niv * Eval | 4 | 30.70 | 7.67 | 2.38 | 0.0764 NS |
| Dil * Niv * Eval | 8 | 83.00 | 10.37 | 3.22 | 0.0106 * |
| Error | 27 | 86.99 | 3.22 | | |
| TOTAL | 53 | 28940.05 | | | |

C.V. 5.90%

Según el ANVA para vitalidad espermática, cuadro 12, presenta diferencias altamente significativas para los factores dilutor, niveles protocolares, evaluación, para la interacción dilutor por evaluación y diferencias significativas en la triple interacción entre dilutor por niveles por evaluación, con un promedio general de 30.45%, desviación estándar de 1.79 y un coeficiente de variación de 5.90%, que demuestra la confiabilidad de los datos.

Los datos obtenidos para motilidad espermática, rechazan la hipótesis nula para los factores Dilutores, Niveles protocolares y Etapas de evaluación, ya que estos presentan diferencias altamente significativas ($P \leq 0.05$).

4.3.1. Vitalidad espermática por el efecto de tres Dilutores

Cuadro 13 Promedios de vitalidad espermática del eyaculado por el efecto de tres dilutores (%)

| Dilutor | Promedio | SD ± | SDR | Extremos | |
|------------|----------|--------|------|----------|-------|
| Dulbecco's | 34.82 | 22.291 | 0.64 | 70.50 | 17.30 |
| PBS | 25.69 | 25.402 | 0.99 | 63.50 | 6.30 |
| Tris | 30.83 | 22.713 | 0.74 | 63.50 | 10.50 |

La vitalidad espermática por el efecto del factor dilutor fue: 34.82, 25.69 y 30.83% para Dulbecco's, PBS y Tris, respectivamente, cuyos valores extremos son muy dispersos, que incrementan los valores de la desviación estándar y desviación estándar relativa, cuadro 13.

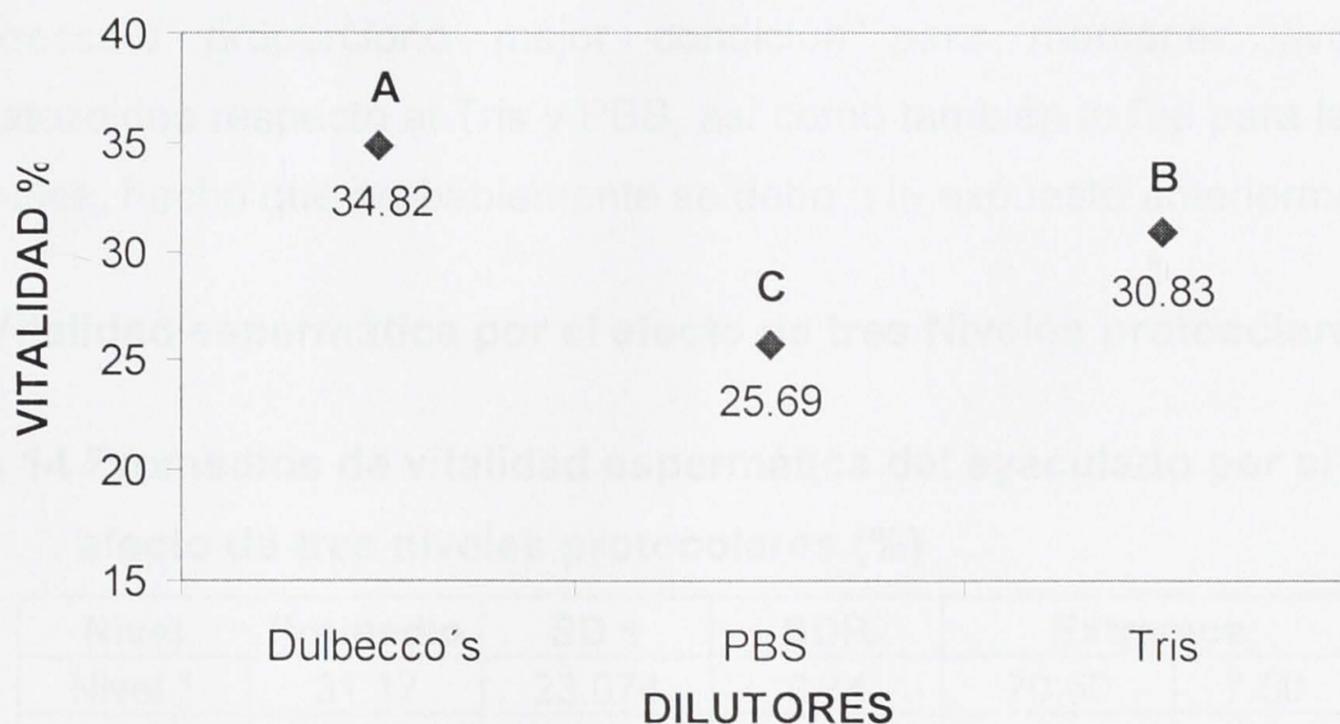


Gráfico 5 Porcentaje de vitalidad espermática del eyaculado por el efecto de tres dilutores

El gráfico 5, muestra los promedios generales, de vitalidad espermática, obtenidos por efecto de someter al eyaculado de llama bulbouretrectomizado a tres dilutores para la críoconservación.

Según la prueba de comparación de medias de Duncan, muestra que el Dulbecco's, medio de cultivo celular, permite mayor vitalidad espermática, con 34.82%, seguido por el dilutor Tris con 30.83% y por último el dilutor PBS con 25.69%.

Salisbury, G., et al., (1982), indica que los espermatozoides tienen que estar vivos para ser fértiles, en el que la motilidad será indicador de dicha viabilidad, donde la composición y concentración de un dilutor son de vital importancia en el proceso de crioconservación del eyaculado, además estará en función a: si el eyaculado tiene gran volumen y una baja concentración espermática, dificultará agregar la proporción adecuada de nutrientes y crioprotectores al eyaculado, ocasionando que este tipo de eyaculados no resistan adecuadamente la congelación.

El Dulbecco's proporcionó mejor condición para mantener vivos a los espermatozoides respecto al Tris y PBS, así como también lo fue para la motilidad espermática, hecho que probablemente se deba a lo expuesto anteriormente.

4.3.2. Vitalidad espermática por el efecto de tres Niveles protocolares

Cuadro 14 Promedios de vitalidad espermática del eyaculado por el efecto de tres niveles protocolares (%)

| Nivel | Promedio | SD ± | SDR | Extremos | |
|---------|----------|--------|------|----------|------|
| Nivel 1 | 31.17 | 23.074 | 0.74 | 70.50 | 7.50 |
| Nivel 2 | 30.94 | 23.648 | 0.76 | 65.00 | 7.00 |
| Nivel 3 | 29.23 | 24.665 | 0.84 | 66.00 | 6.30 |

Los promedios de vitalidad espermática por el efecto de Niveles protocolares fueron: 31.17, 30.94 y 29.23% para Nivel 1, Nivel 2 y Nivel 3 respectivamente, cuyos rangos en los valores extremos son muy dispersos, que incrementan los valores de la desviación estándar y desviación estándar relativa, cuadro 14.

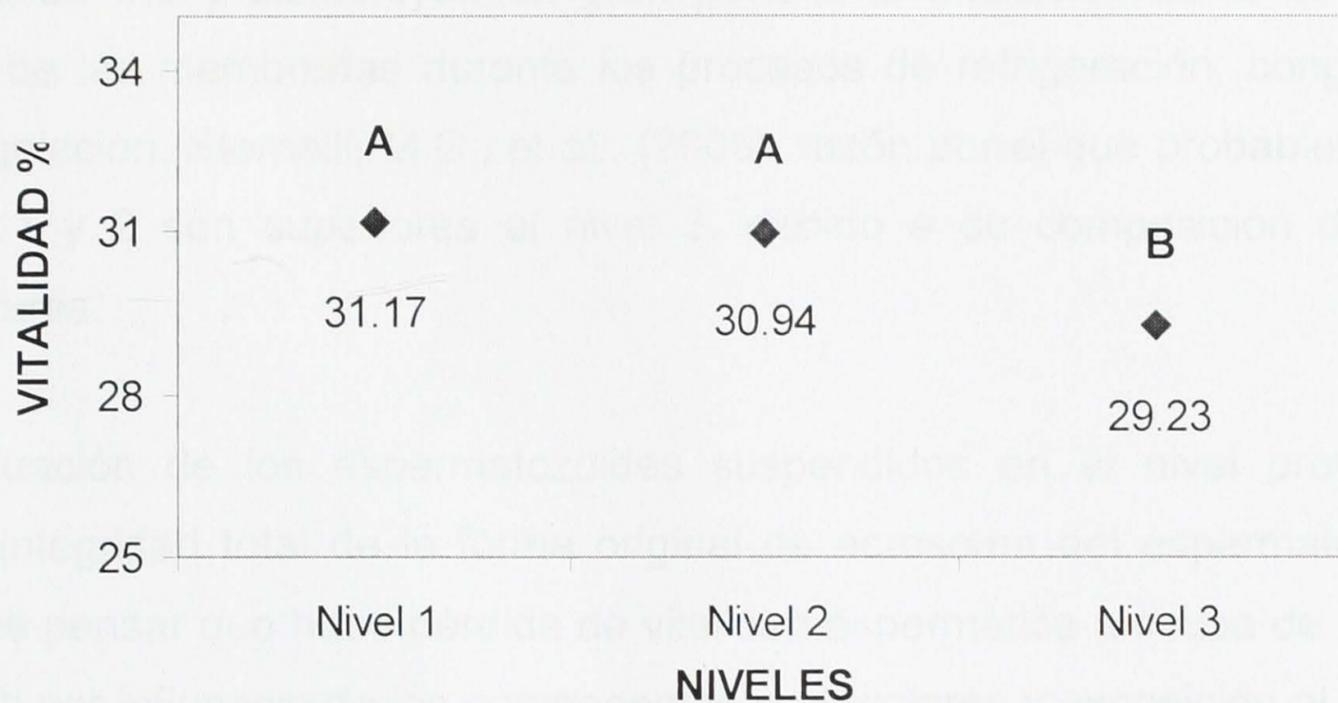


Gráfico 6 Porcentaje de vitalidad espermática del eyaculado por el efecto de tres niveles protocolares

El gráfico 6 muestra los promedios generales, de vitalidad espermática, obtenidos por efecto de someter los espermatozoides a tres niveles protocolares en el proceso de crioconservación.

Según la prueba de Duncan, los niveles 1 y 2, resultaron proporcionar mayor vitalidad espermática con promedios de 31.17 y 30.94%, respectivamente, no habiendo diferencias estadísticas entre ambos, cuyas proporciones protocolares fueron: Dilutor 64%; Suero de llama 15%; Yema de huevo 15%; Glicerina 6% y Dilutor 54%; Suero de llama 20%; Yema de huevo 20%; Glicerina 6%, respectivamente, siendo estos significativamente superiores al Nivel 3 promedio de motilidad espermática de 29.23% cuya proporción protocolar fue: Dilutor 44%; Suero de llama 35%; Yema de huevo 15%; Glicerina 6%.

Existen muchos factores que afectan a la vitalidad espermática, entre ellos la composición del dilutor, fuente de energía, agente protector debido a que los fosfolípidos y las lipoproteínas de baja densidad poseen un efecto protector contra

el shock de frío y disminuyen en gran parte a la alteración de la estructura y función de las membranas durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación, Stornelli, M.C., et al., (2005), razón por el que probablemente los Niveles 1 y 2 son superiores al nivel 3, debido a su composición de niveles protocolares.

La evaluación de los espermatozoides suspendidos en el nivel protocolar 3, mostró integridad total de la forma original de acrosoma del espermatozoide, lo que hace pensar que hubo pérdida de vitalidad espermática a causa de la presión osmótica por influencia de los componentes protocolares y exposición al descenso de temperatura de proceso del eyaculado.

4.3.3. Vitalidad espermática durante el proceso de crioconservación

Cuadro 15 Promedios de vitalidad espermática del eyaculado por el efecto del proceso de crioconservación (%)

| Evaluaciones | Promedio | SD ± | SDR | Extremos | |
|---------------------|-----------------|-------------|------------|-----------------|-------|
| Refrigerado | 62.54 | 3.459 | 0.055 | 70.50 | 55.30 |
| Descongelado | 15.02 | 5.327 | 0.355 | 23.50 | 7.30 |
| A 2 semanas | 13.79 | 5.063 | 0.367 | 21.30 | 6.30 |

Al igual que la motilidad, la vitalidad espermática durante el proceso de crioconservación tuvo variaciones, así que se tuvo una motilidad espermática de 62.54% en la etapa de refrigeración, con una desviación estándar de ± 3.459 y una desviación estándar relativa de 0.055 que le da confiabilidad a los valores obtenidos en esta primera etapa. Posterior al refrigerado, se obtuvo una motilidad espermática de 15.02%, en el descongelado y una desviación estándar de ± 5.327 , con alto rango en los valores extremos. A las 2 semanas del proceso de

crioconservación, se obtuvo un promedio de 13.79% con una desviación estándar de ± 5.063 , valores que demuestran ser no confiables a causa del alto rango registrado en los valores extremos de ambas etapas, cuadro 15.

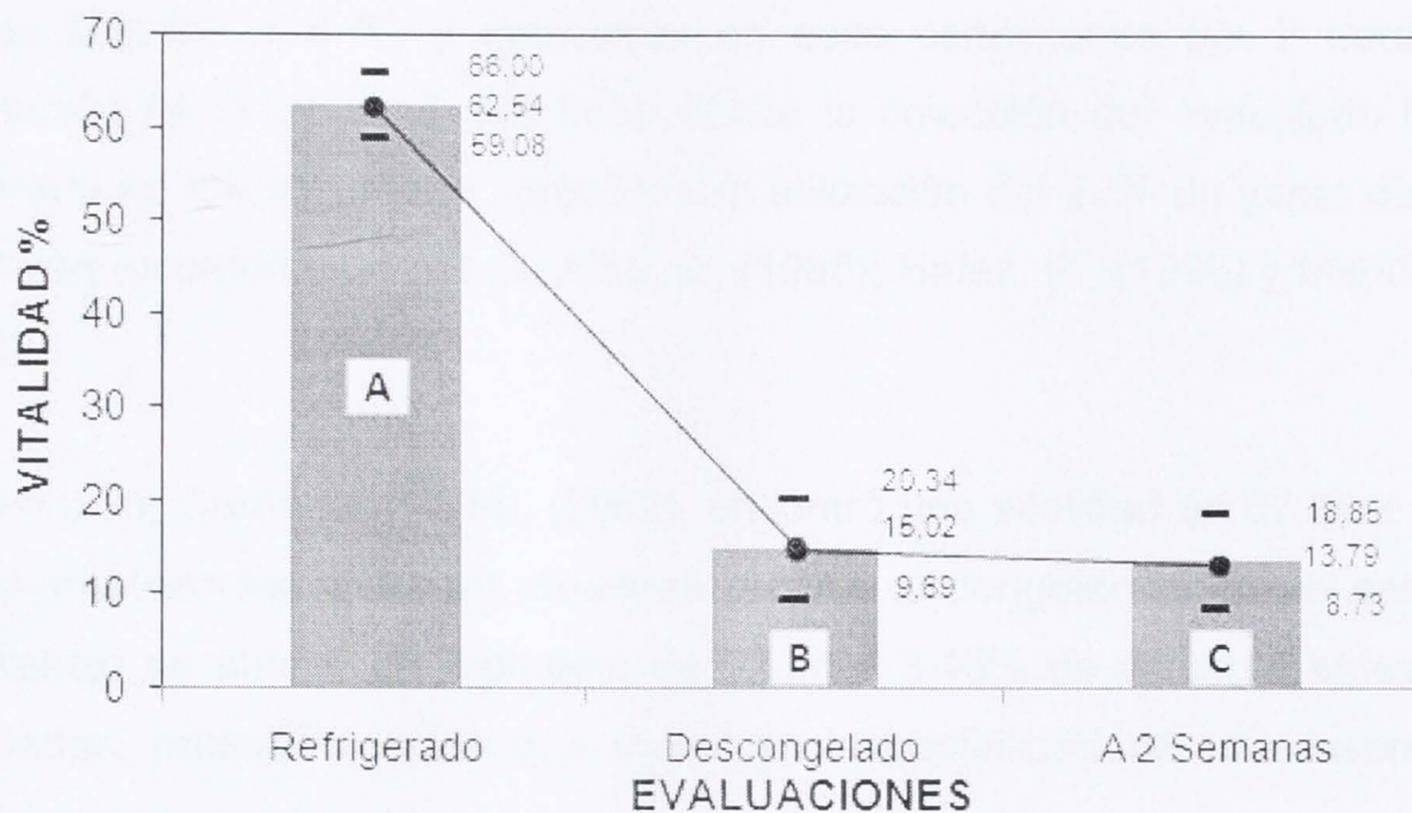


Gráfico 7 Porcentaje de vitalidad espermática del eyaculado por el efecto del proceso de crioconservación

El gráfico 7, muestra el comportamiento de vitalidad espermática, evaluados en el momento del refrigerado, descongelado y a las 2 semanas después de haber procesado el eyaculado.

A la prueba de Duncan, se observa un porcentaje de vitalidad espermática en la etapa de refrigerado de $62.54 \pm 3.46\%$, superior a las etapas de descongelado y a 2 semanas del proceso de crioconservación, con promedios de $15.02 \pm 5.33\%$ y $13.79 \pm 5.06\%$ de vitalidad espermática, respectivamente, no habiendo diferencias significativas entre estas dos últimas etapas, descongelado y a 2 semanas.

Luego de obtener una vitalidad espermática de $73.00 \pm 2.00\%$, en el momento de la colección, este porcentaje bajo a $62.54 \pm 3.46\%$ de vitalidad hasta el refrigerado, como se mostró en el gráfico 7, donde se tuvo una pérdida del 14.33% de la vitalidad total, debido a que los espermatozoides sufrieron un choque de frío, los que llegaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y estuvieron en esas condiciones por 2 horas. Esta disminución de la vitalidad que hubo desde la colección del eyaculado hasta el refrigerado no fue aún mayor, gracias a la utilización del 20% de yema de huevo, proporción recomendado por De Alba, J., (1985); Hafez, E., (1996) y Mendoza, C., (2000).

Por otro lado, Cárdenas, N. M., (2002), encontró una vitalidad de $67.08 \pm 10.04\%$ de espermatozoides vivos en muestras previas al congelamiento, en cambio en este trabajo se obtuvo un promedio de $62.54 \pm 3.46\%$ de vitalidad antes de ser congelados, promedios altos que muestran la posibilidad de una inseminación artificial con semen fresco.

La vitalidad mostrada en semen fresco fue $68.50 \pm 12.30\%$, Aller, et al., 2003, superiores a los mostrados en el presente trabajo con $62.54 \pm 3.46\%$, debido a que las temperaturas inferiores a los $14\text{ }^{\circ}\text{C}$, causan alteraciones en la membrana espermática disminuyendo la calidad de semen, y temperaturas por arriba de los $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ no disminuyen el metabolismo espermático ni detienen el crecimiento bacteriano. Lo cual disminuyen la vida útil del semen (Maquera, L., 2001).

Posterior a la refrigeración, la vitalidad descendió notablemente, al igual que la motilidad espermática, mencionada anteriormente, a un porcentaje de vitalidad espermática de $15.02 \pm 5.33\%$, en la etapa de descongelado, donde se perdió el 79.42% de la vitalidad total.

La viabilidad mostrada posterior al descongelamiento fue inferior al reportado por Aller, et al., 2003 con $32.40 \pm 10.50\%$ de vitalidad, debido a que el daño a la membrana puede no ser completamente expresado inmediatamente después de la descongelación (Catena, M., et al., 1999).

De la misma forma, a la prueba de medias de Duncan, el porcentaje en promedio de la vitalidad espermática, que se obtuvo en la etapa de evaluación a las 2 semanas del congelado fue de $13.79 \pm 5.06\%$, perdiendo definitivamente hasta esta etapa el 81.11% de la vitalidad total, como se mostró en la gráfica 7.

En general, la sobrevivencia de los espermatozoides a la congelación depende del: tamaño celular, relación volumen superficie, permeabilidad al agua, coeficiente de temperatura de dicha permeabilidad, motivo por el que es difícil extrapolar procedimientos de congelación de semen de una especie a otra. (Boggio, J.C., 2003), por ello cabe señalar, para diferentes tipos celulares existe una velocidad de enfriamiento óptima llamada curva crítica (Mazur y col., 1972), como se ilustra en el anexo 7.

Así mismo, Stornelli, A., et al., 2005, observaron la pérdida de vitalidad y motilidad espermática ocasionado por el proceso de enfriamiento entre los 5 y $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, el cambio de fase por el calentamiento del medio celular, luego de la descongelación, siendo ésta última la que ocasiona mayores daños, cuyas evidencias se manifestaron en la integridad de la membrana espermática.

4.3.4. Interacción de Dilutores por Etapas de evaluación

Cuadro 16 ANVA del efecto de la interacción de Dilutores por Etapas de evaluación sobre la vitalidad espermática del eyaculado (%)

| F.V. | G.L. | S.C. | C.M. | F Cal | Pr > F |
|---------------|------|----------|---------|---------|-----------|
| Ev (Dul) | 2 | 8363.91 | 4181.95 | 754.29 | <.0001 ** |
| Ev (PBS) | 2 | 10914.75 | 5457.38 | 1503.27 | <.0001 ** |
| Ev (Tris) | 2 | 8643.77 | 4321.89 | 513.44 | <.0001 ** |
| Dil (Ref) | 2 | 73.55 | 36.78 | 4.25 | 0.0345 NS |
| Dil (Des) | 2 | 411.96 | 205.98 | 43.91 | <.0001 ** |
| Dil (A 2 Sem) | 2 | 372.07 | 186.03 | 43.81 | <.0001 ** |

El cuadro 16 muestra el efecto de la interacción de dilutor por la etapa de evaluación sobre la vitalidad espermática, en el que se observa diferencias altamente significativas ($P \leq 0.05$) entre las interacciones evaluaciones por los dilutores Dulbecco's, PBS y Tris, como también existen interacción entre dilutores por la etapa de evaluación al descongelado y a las 2 semanas de haber procesado el eyaculado, no habiendo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre la interacción dilutor por la etapa de refrigeración.

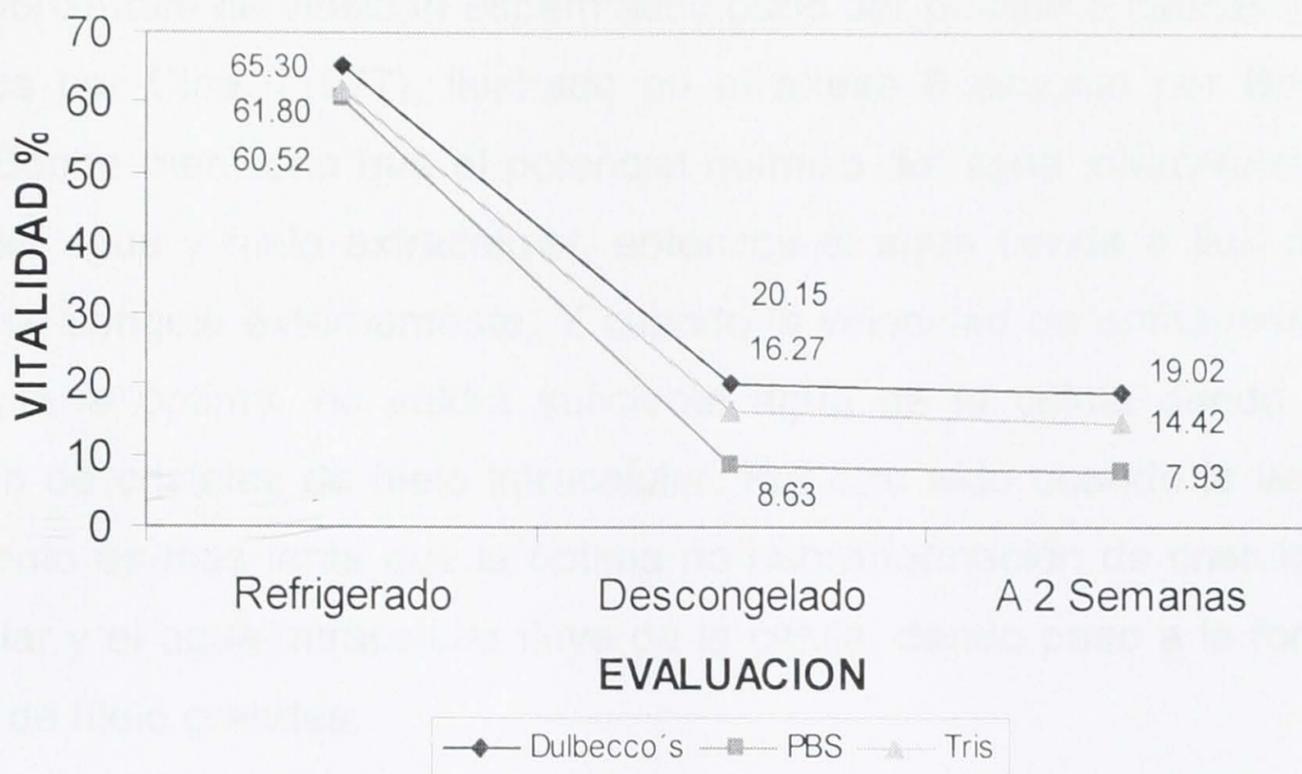


Gráfico 8 Efectos simples del porcentaje de vitalidad espermática del eyaculado por el efecto de la interacción Dilutores por Etapas de evaluación

En el gráfico 8 se observa que en la etapa de refrigerado, aparentemente los tres dilutores mantuvieron la vitalidad espermática de acuerdo a la capacidad de cada dilutor con 65.30, 61.80 y 60.52% para Dulbecco's Tris y PBS, posterior a esta etapa, se observa que el Dulbecco's trajo mejores resultados de vitalidad en la etapa del descongelado, con promedios de 20.15%, seguido del Tris y PBS con 16.27 y 8.63% respectivamente, después de haber sufrido los efectos de la curva de congelamiento. Posterior a ésta etapa, se mantuvo relativamente igual los promedios de vitalidad espermática a dos semanas de haber congelado el eyaculado con 19.02% para el Dulbecco's, y 14.42, 7.93% para el Tris y PBS respectivamente.

El bajo porcentaje de vitalidad espermática pudo ser posible a causas de factores señalados por Ciba, (1977), ilustrado en el anexo 8 descrito por Boggio, J.C., (2003). Donde menciona que el potencial químico del agua intracelular es mayor que el del agua y hielo extracelular, entonces el agua tiende a fluir fuera de la célula y se congela externamente. Y cuando la velocidad de enfriamiento es muy rápida que la óptima, no saldrá suficiente agua de la célula dando paso a la formación de cristales de hielo intracelular. Por otro lado cuando la velocidad de enfriamiento es mas lenta que la óptima no habrá formación de cristales de hielo intracelular y el agua intracelular fluye de la célula, dando paso a la formación de cristales de hielo grandes.

Cuando se congela el agua extracelular los solutos se concentran y fluye agua de la célula para equilibrar el medio y de continuar este proceso, habrá hipertonicidad intracelular el que causará lesión. A esta dinámica del agua, que fluye de la célula al medio y produce alteraciones en la composición y propiedades de las soluciones intra y extracelular, se lo conoce como efecto solución. (Mazur, 1965 y 1966). Por este motivo es importante disminuir el efecto solución, sumergiendo el eyaculado en nitrógeno líquido conforme a un descenso de temperatura apropiado.

4.3.5. Interacción de Niveles protocolares por Etapas de evaluación

Cuadro 17 ANVA del efecto de la interacción de Niveles protocolares por Etapas de evaluación sobre la vitalidad espermática del eyaculado (%)

| F.V. | G.L. | S.C. | C.M. | F Cal | Pr > F |
|---------------|------|----------|---------|--------|-----------|
| Ev (Niv 1) | 2 | 8594.40 | 4297.20 | 141.17 | <.0001 ** |
| Ev (Niv 2) | 2 | 9159.74 | 4579.87 | 198.11 | <.0001 ** |
| Ev (Niv 3) | 2 | 10095.14 | 5047.57 | 306.44 | <.0001 ** |
| Niv (Ref) | 2 | 2.05 | 1.02 | 0.08 | 0.9269 NS |
| Niv (Des) | 2 | 33.46 | 16.73 | 0.56 | 0.5832 NS |
| Niv (A 2 Sem) | 2 | 35.52 | 17.76 | 0.67 | 0.5285 NS |

El cuadro 17 muestra el efecto de la interacción de niveles protocolares por las etapas de evaluación sobre la vitalidad espermática, en el que se observa que existen diferencias altamente significativas ($P \leq 0.05$) entre las interacciones evaluaciones por los Niveles 1, 2 y 3. Por otro lado también se observa que no existen diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre la interacción Niveles por las etapas de refrigeración, descongelado y a 2 semanas de crioconservado el eyaculado.

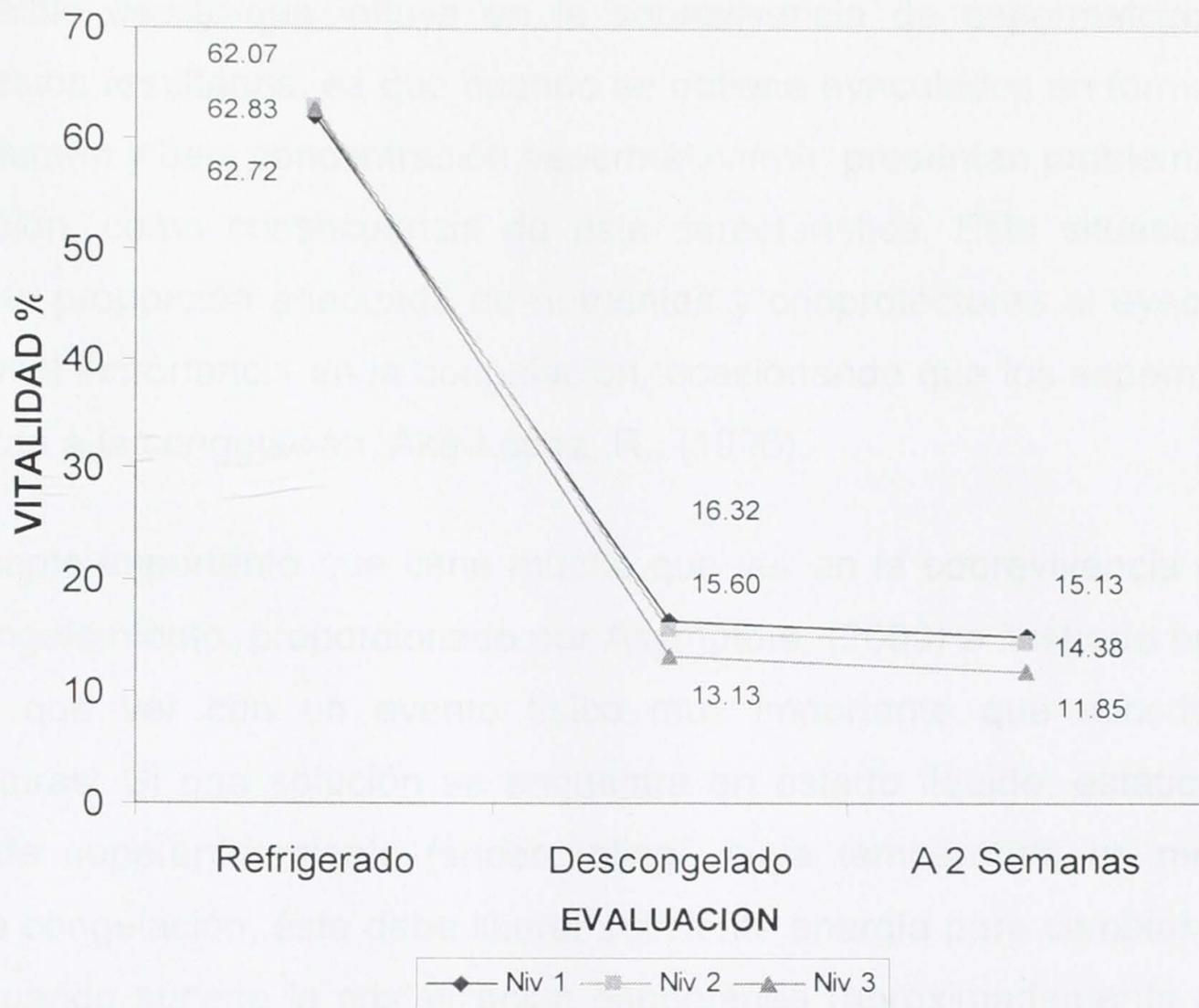


Gráfico 9 Efectos simples del porcentaje de vitalidad espermática del eyaculado por el efecto de la interacción de Niveles protocolares por Etapas de evaluación

En el gráfico 9 podemos observar la dinámica de la vitalidad espermática suscitada durante las etapas del proceso de crioconservación, que de acuerdo con el cuadro 17 resultan tener diferencias altamente significativas ($P \leq 0.05$) en donde encontramos el 62.07, 62.83 y 62.72% de vitalidad para los niveles 1, 2 y 3, en la etapa de refrigeración. Posterior de ser sometidos al congelamiento este desciende bruscamente a 16.32, 15.60 y 13.13%, de vitalidad para los niveles 1, 2 y 3. De la misma forma se expresó similar comportamiento a las 2 semanas del congelado en donde finalmente se encontró porcentajes de vitalidad espermática de 15.13, 14.38 y 11.85% para los niveles 1, 2 y 3.

Otra posible causa que influye en la sobrevivencia de espermatozoides, que explica estos resultados, es que cuando se obtiene eyaculados en forma "diluida", (gran volumen y baja concentración espermática/ml), presentan problemas para su congelación, como consecuencia de esta característica. Esta situación dificulta agregar la proporción adecuada de nutrientes y crioprotectores al eyaculado que son de vital importancia en la congelación, ocasionando que los espermatozoides no resistan a la congelación, Aké-López, R., (1996).

Un concepto importante que tiene mucho que ver en la sobrevivencia de células en el congelamiento, proporcionado por Asymptote, (2003) e ilustrado en el anexo 9, tiene que ver con un evento físico muy importante que sucede a bajas temperaturas: Si una solución se encuentra en estado líquido, estática y en un estado de superenfriamiento (supercooling), cuya temperatura es menor a su punto de congelación, ésta debe liberar suficiente energía para cambiar de estado físico. Cuando sucede la cristalización espontánea (aproximadamente entre los -10 a -15 °C), la energía acumulada se libera en forma de calor y la temperatura llega hasta el verdadero punto de congelación de la solución (aproximadamente de -4 a -7 °C). Este brusco cambio de temperatura es letal para las células y para congelación del medio, es lo que se conoce por *seeding*.

Por este motivo, Mazur, (1966) descrito por Boggio, J.C., (2003), coinciden con los anteriores, al mencionar que los factores que producen lesión celular dependen del efecto solución, con la formación de cristales de hielo intracelular, temperatura, tiempo, velocidad del cambio de temperatura, el estado físico del agua y concentración de solutos disueltos en el medio, los que definen el punto de cambio de estado líquido al sólido en la congelación para cada tipo celular, causas que dieron como efecto la baja tasa de vitalidad espermática en el presente trabajo.

4.3.6. Interacción de Dilutores por Niveles protocolares por Etapas de evaluación

Cuadro 18 Promedios de vitalidad espermática del eyaculado por el efecto de la interacción de Dilutores por Niveles protocolares por Etapas de evaluación (%)

| Dilutores | Dulbecco's | | | PBS | | | Tris | | |
|--------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Niv 1 | Niv 2 | Niv 3 | Niv 1 | Niv 2 | Niv 3 | Niv 1 | Niv 2 | Niv 3 |
| Refrigerado | 68.40 | 62.75 | 64.75 | 57.80 | 63.00 | 60.75 | 60.00 | 62.75 | 62.65 |
| Descongelado | 19.90 | 21.90 | 18.65 | 9.90 | 8.15 | 7.85 | 19.15 | 16.75 | 12.90 |
| A 2 semanas | 20.15 | 19.50 | 17.40 | 8.25 | 8.15 | 7.40 | 17.00 | 15.50 | 10.75 |

El cuadro 18, muestra la triple interacción Dilutor por Nivel protocolar y etapas de Evaluación, donde se puede observar que se obtuvo el mejor porcentaje de vitalidad espermática de 68.40% empleando el dilutor Dulbecco's con el nivel protocolar 1, al Refrigerado, al Descongelado se obtuvo mejores resultados de vitalidad, 21.90% empleando nuevamente el Dulbecco's, con el nivel protocolar 2, por último en las 2 semanas al procesado del eyaculado, se obtuvo el 20.15% de vitalidad empleando Dulbecco's en nivel protocolar 1. El dilutor PBS mostró mínimos porcentajes de vitalidad respecto a los dos restantes, por presentar el 57.80% de vitalidad en el Refrigerado con el nivel 1, empleando el nivel protocolar 3 se tuvo 7.85 y 7.40% de vitalidad en el Descongelado y a las 2 semanas.

Los aspectos de Interrelación entre las células, medio de conservación, biología celular, categoría del crioprotector y velocidad de disminución de la temperatura, son los que constituyen una compleja ecuación biofísica, bioquímica y molecular a los que se referían Mazur, (1966); Ciba, (1977); Aké-López, R., (1996); Boggio, J.C., (2003), para encontrar y poder sobrellevar la vitalidad celular mas allá del *seeding Asymptote*, (2003).

5. CONCLUSIONES

El eyaculado colectado de llamas, cuyas glándulas fueron bulbouretrectomizadas, es un material libre de viscosidad, fluido, en un volumen promedio de 1.70 ml, con espermatozoides suspendidos de forma homogénea, con promedio de concentración de 75.33×10^6 espermatozoides/ml, $64.00 \pm 2.00\%$ y $73.00 \pm 2.00\%$ de motilidad y vitalidad espermática respectivamente, el que se puede diluir libremente con cualquier material expansor de críoconservación.

La motilidad como la vitalidad espermática dependerá de la calidad del dilutor que se emplee para el mantenimiento de los espermatozoides, cuyos promedios generales, encontrados en el presente trabajo, por el efecto dilutor fueron: 29.85; 27.57 y 21.26% de motilidad para el Dulbecco's, Tris y PBS, respectivamente, los porcentajes de vitalidad espermática fueron: 34.82; 30.83 y 25.69% para Dulbecco's, Tris y PBS, siendo el Dulbecco's un dilutor que ofrece mayor oportunidad de sobrevivencia a los espermatozoides sometidos a la críoconservación ($P \leq 0.05$), respecto al Tris y PBS. Este hecho probablemente se deba a que este dilutor se caracteriza por ser un medio de cultivo celular que cumple con las necesidades fisiológicas celulares.

Un incremento de cualquier componente del nivel protocolar puede repercutir negativamente sobre la motilidad y vitalidad de los espermatozoides, como se puede observar que el Nivel 2 y Nivel 1 fueron los niveles que mejor mantuvieron a los espermatozoides con motilidad, a comparación del Nivel 3, con promedios generales de 27.07; 26.71 y 24.91% respectivamente. Así también hubo un similar comportamiento del Nivel 1 y Nivel 2 sobre la vitalidad espermática, manteniendo mejor a los espermatozoides con vida respecto al Nivel 3, cuyos porcentajes generales fueron; 31.17; 30.94 y 29.23% respectivamente.

La motilidad y vitalidad espermática se vio afectada de forma letal por la sensibilidad al descenso de temperatura de crioconservación, donde se perdió el 15.95% de la motilidad total desde la Colección hasta la etapa de Refrigerado, hasta donde es posible la inseminación artificial con semen fresco; seguidamente se perdió el 79.90% hasta el Descongelado inmediato y el 81.20% hasta las 2 semanas de haber procesado el eyaculado. De la misma forma se tuvo pérdida del 14.33% de la vitalidad total desde la Colección hasta el Refrigerado; 79.42% hasta el Descongelado y el 81.11% hasta las 2 semanas del proceso de crioconservación.

Los factores, Dilutor y Niveles protocolares son elementos muy importantes que se interrelacionan entre si en cada etapa de la crioconservación ya que un dilutor satisfactorio empleado en la crioconservación de semen en una especie animal puede no ser para otras especies, mas la concentración de las partículas que contiene los Niveles protocolares, influyen en la velocidad de disminución de temperatura, punto de congelación y temperatura final.

La motilidad y vitalidad espermática en el proceso de la crioconservación, se hallan vulnerables desde la etapa de colección, refrigeración y principalmente en la congelación, siendo el *seeding* un punto que determina el éxito de la viabilidad de los espermatozoides, cuyo punto dependerá de: la temperatura, tiempo, velocidad del cambio de temperatura, el estado físico del agua, biología celular, dilutor, crioconservante y concentración de solutos disueltos en el medio, los que hacen una compleja ecuación biofísica, bioquímica y molecular para determinar una curva de descenso de temperatura para la crioconservación del eyaculado de llama bulbourectomizado.

6. RECOMENDACIONES

- Continuar con estudios de colección que sean efectivos y muestren una buena calidad de eyaculado, con buenos volúmenes, óptima concentración espermática y baja contaminación bacteriana.
- Determinar la composición bioquímica del eyaculado, libre de secreciones de las glándulas bulbouretrales, cuya base científica servirá para desarrollar un dilutor acorde con los requerimientos nutricionales, tamponantes y crioprotectores de espermatozoides.
- Desarrollar el porcentaje de componentes protocolares de dilución adecuado, de: suero, yema de huevo, glicerina u otros, que permitan motilidad y vitalidad espermática apta para la inseminación artificial con eyaculado de llama bulbourectomizado.
- Desarrollar una curva de congelamiento que describan: tiempos y temperaturas de descenso, punto del *seeding* e inmersión en nitrógeno líquido, en función a la biología celular, estado físico del complejo diluyente-eyaculado, para la críoconservación de eyaculados de llamas bulbourectomizados.
- Realizar estudios de termo resistencia en las fases de evaluación de colecta, refrigeración, post descongelamiento y periodos posteriores al procesado del eyaculado de llama intervenida, para observar la capacidad fecundante en la inseminación artificial.
- Realizar principalmente un test de resistencia osmótica, cuyo examen *in vitro* está correlacionado altamente con la fertilidad de los espermatozoides.

- Vistos los porcentajes de motilidad y vitalidad espermática, obtenidos en la etapa de refrigeración, realizar estudios de inseminación artificial con este material homogéneo y libre de viscosidad para observar la fertilidad del eyaculado.
- Estudiar el daño provocado al espermatozoide en las etapas de refrigeración, congelación y descongelación, evaluando integridad de membrana (estructural y funcional), ADN (distribución, maduración y estructura), capacitación y reacción acrosomal.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Achata, R., (1989), Concentración de algunos componentes químicos del plasma seminal de alpaca. Tesis Universitaria del Altiplano. FMVZ. Puno-Perú.
- Aké-López, R., (1997), Efecto de la remoción parcial del plasma seminal sobre la congelabilidad del semen bovino. Revista Biomédica. Volumen 8. No.1 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán. P -116. Yucatán - México.
- Alanocca, F., (1978), Descripción de algunos aspectos macroscópicos y microscópicos del aparato reproductor masculino de la alpaca (*Lama pacos*). Tesis FMVZ. UNA. Puno-Perú.
- Aller, J.F. et al., (2003), Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). Arch. Zootecnia. 52: 15-23. Disponible en [http:// www.uco.es](http://www.uco.es)
- ASYMPTOTE, Disponible en [http:// www.asymptote.co.uk](http://www.asymptote.co.uk)
- Bearden, H. y Fuquay, J., (1982), Reproducción animal aplicada. Segunda Edición. Editorial el Manual Moderno. México.
- Boggio, J.C., (2003), Avances. Transferencia de embriones y biotecnología. Capítulo 8. Universidad Austral de Chile.
- Bravo, P.W., (1998), Avances en la fisiología reproductiva del macho llama y alpaca. XXI Reunión Científica Anual (APPA). FMVZ. UNA. Puno-Perú.

- Bravo, P.W., (1997), Collection of semen and artificial insemination of alpacas, *Theriogenology* 47: 619-626.
- Calzada, J., (1990), Métodos estadísticos para la investigación. Universidad Agraria La Molina. Lima Perú.
- Cárdenas, N.M., (2002), Inseminación artificial con espermatozoides congelados colectados de los conductos deferentes en alpacas. Tesis Universitaria. FMVZ. UNA. Puno-Perú.
- Catena, M., et al., (1999), Evaluación de semen bovino congelado. Simposio Internacional de reproducción Bovina (UNCPBA). Buenos Aires – Argentina.
- Copa, S., et al., (2003), Técnicas de bulbouretrectomía en llama (*Lama glama*) macho. Resumen. Memoria III Congreso Mundial sobre Camélidos. Potosí-Bolivia.
- Charaja, W., (1999), Naturaleza química de las secreciones de las glándulas accesorias de la alpaca. Tesis Universitaria. FMVZ. UNA. Puno-Perú.
- De Alba, J., (1985), Reproducción Animal. Editorial “ La Prensa Médica Mexicana “ S.A. México DF.
- Delgado, P., et al., (2000-2003), Técnicas de colección de semen en llamas (*Lama glama*). Resumen. Memoria III Congreso Mundial sobre Camélidos. Potosí-Bolivia.
- Decuadro-Hansen, (1997), Apuntes del curso de evaluación del semen, Centro de Inseminación Artificial CLIA S.A. Urdinarrain, Entre Ríos-Argentina.

- Derivaux, J., (1982), Reproducción de los animales domésticos. Segunda Edición. Editorial Acribia. Zaragoza-España.
- Evans, G. y Maxwell, W., (1990), Inseminación artificial de ovejas y cabras. Edición. Editorial Acribia. Zaragoza-España.
- Evans, G. y Maxwell, W., (1987), Salomon's artificial insemination of sheep and goats. Editorial Bulter Worths Pty Limited. National Library. Australia.
- Gonzales, V., (2003), Efecto de la bulbouretrectomía y periodicidad de colección en las características macro y microscópicas del eyaculado en llamas de tres edades. Tesis de Grado. UAC-T / UCB. La Paz, Bolivia.
- Garnica, J. y Fuentes, C., (1998), Caracterización físico química del semen de llamas. XXI Reunión Científica Anual. FMVZ. UNA. Puno-Perú.
- Hafez, E., (1996), Reproducción e inseminación artificial en animales. Sexta Edición. Editorial Editorial Mc Graw Hill. México D.F.
- Hafez, E., (2000), Reproducción e Inseminación artificial. Séptima Edición, Editorial Mc Graw Hill. México D.F.
- Illera, M., (1994), Reproducción de los Animales Domésticos. Primera Edición. Editorial Aedos. Barcelona – España.
- Kolb, E., (1979), Fisiología Veterinaria. Tercera Edición. Editorial Acribia. Zaragoza-España. Volumen II.
- Laruta, D., (2002), Componentes bioquímicos en la secreción de las glándulas bulbouretrales de llama. Tesis de Grado. UAC-T / UCB. La Paz, Bolivia.

- Maqueda, L., (2001), Conservación de la calidad del Semen: Diluyentes, Empaque, Temperatura y Transporte.
- Mendoza, C., (2000), Evaluación de cuatro dilutores para la conservación de semen de Alpacas, Tesis Universitaria. FMVZ. UNA. Puno-Perú.
- Pérez, G., (2000), Avances de Inseminación Artificial en Camélidos. comp.. Puno-Perú.
- Quintano, J., (2001), Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpacas (lama pacos) colectados del conducto deferente, utilizando 3 dilutores. Tesis Universitaria. FMVZ. UNA. Puno-Perú.
- Quispe, F., (1987), Evaluación de las características físicas del semen de la alpaca durante la época del empadre. Tesis Universitaria. FMVZ. Puno-Perú.
- Rillo, S., (1982), Reproducción e Inseminación Animal Porcina. Primera Edición. Editorial Aedos. Barcelona – España.
- Sanz, E., et al., (2004), Andrología. Medicina Reproductiva. Disponible en <http://www.encolombia.com>. Internet.
- Salisbury, G., et al., (1982), Fisiología de la reproducción o inseminación artificial de los bóvidos. Segunda Edición. Editorial Acribia. Zaragoza-España.
- Sigma-Aldrich, (2005-2006), Cell cultura manual. Unrivaled Scientific Knowledge for Your Success, Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc, Print in USA

Stornelli, A., et al., (2005), Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. Criopreservación y fertilidad seminal. Analecta Veterinaria Universidad Nacional de La Plata. La Plata – Argentina.

Sumar, J., (1984), Mejoramiento de la fisiología reproductiva en los camélidos domésticos alpaca y llama. I Seminario Internacional de Camélidos Sudamericanos. Arica –Chile.

Valdivia, M., et al., (2003), Manejo y crío preservación del semen de alpaca. Reuniones Científicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Facultad de Ciencias Biológicas. Disponible en <http://www.facultadcienciasbiologicas.htm>

Von Baer, M.V., et al., (1998), Variables seminales en llama (*Lama glama*). Archivos Medicina Veterinaria. Volumen 30. No. 2.

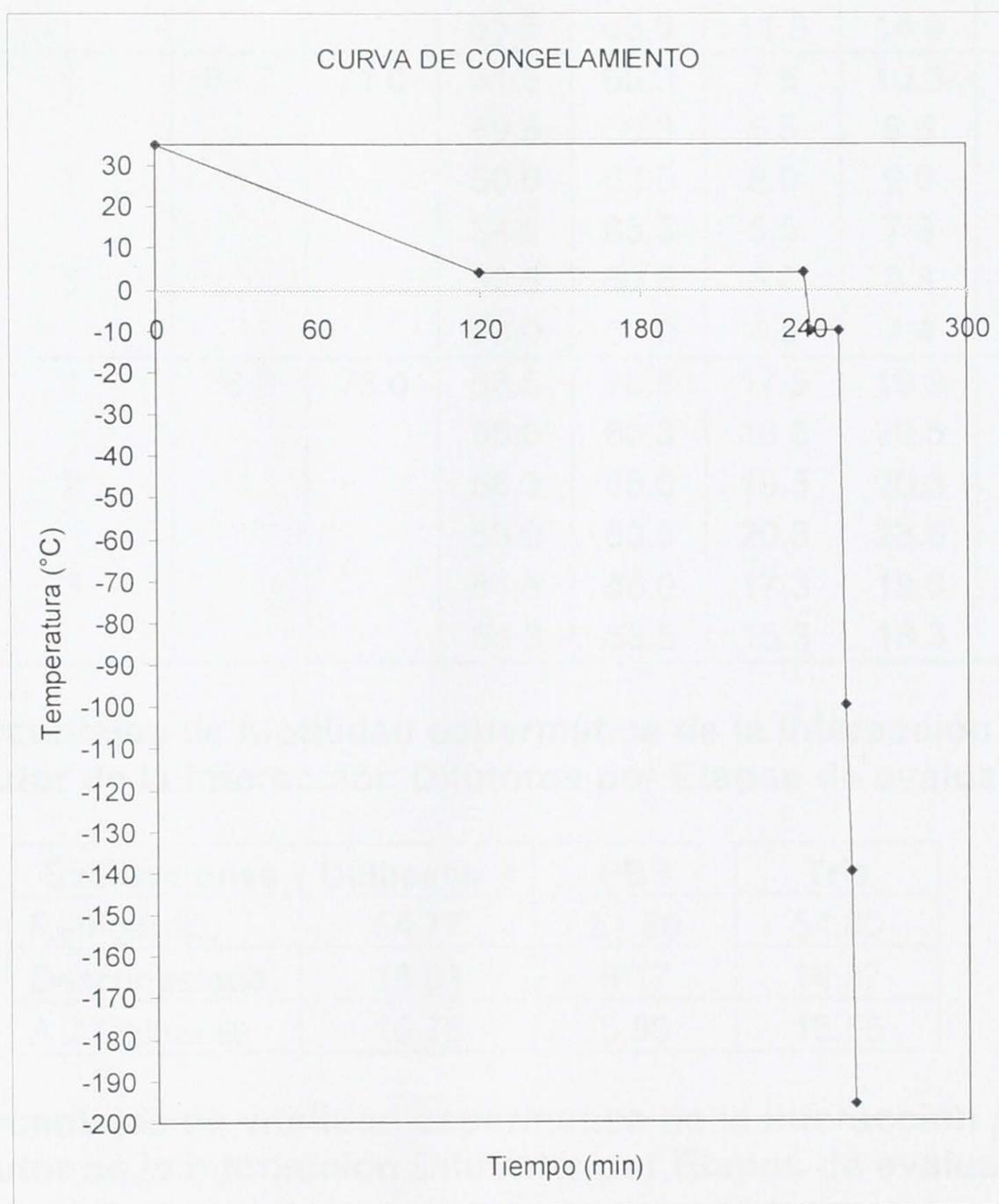
Villena, E., et al., (2002), Técnico en ganadería. Editorial Cultural S.A.. Tomo 2. Madrid – España.

Waldspurger, K., (1987), Comparación de dos diluyentes para la congelación de semen ovino. Tesis de Grado. Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile

ANEXOS

Anexo 1 Curva de congelamiento descrita por Decuadro-Hansen, (1997).

| .Temperatura °C | | Velocidad (°C/min) |
|-----------------|----------------------------|--------------------|
| Desde | Hasta | |
| 4 °C | - 10 °C (<i>seeding</i>) | 5 |
| - 10 °C | - 100 °C | 40 |
| - 100 °C | - 140 °C | 20 |
| - 140 °C | N ₂ L | |



Anexo 2 Resultados generales de los porcentajes de motilidad y vitalidad espermática

| Dilutores | Niveles | Colección | | Refrigeración | | 1er Descongelado | | 2do Descongelado | |
|------------|---------|-----------|--------|---------------|--------|------------------|--------|------------------|--------|
| | | Mot. % | Vit. % | Mot. % | Vit. % | Mot. % | Vit. % | Mot. % | Vit. % |
| Tris | 1 | 62.0 | 73.0 | 56.0 | 63.5 | 15.3 | 18.0 | 15.0 | 16.0 |
| | | | | 50.3 | 56.5 | 18.3 | 20.3 | 16.5 | 18.0 |
| | 2 | | | 57.5 | 63.0 | 16.3 | 17.0 | 16.0 | 16.0 |
| | | | | 54.5 | 62.5 | 14.5 | 16.5 | 12.5 | 15.0 |
| | 3 | | | 55.0 | 62.3 | 10.3 | 11.5 | 10.0 | 10.5 |
| | | | | 55.5 | 63.0 | 11.5 | 14.3 | 11.3 | 11.0 |
| PBS | 1 | 64.0 | 71.0 | 51.3 | 60.3 | 7.5 | 10.3 | 7.0 | 9.0 |
| | | | | 49.5 | 55.3 | 5.5 | 9.5 | 5.0 | 7.5 |
| | 2 | | | 50.0 | 62.5 | 8.0 | 9.0 | 7.5 | 9.3 |
| | | | | 54.5 | 63.5 | 5.5 | 7.3 | 5.0 | 7.0 |
| | 3 | | | 52.5 | 60.5 | 6.0 | 8.3 | 6.0 | 8.5 |
| | | | | 53.0 | 61.0 | 4.5 | 7.4 | 4.3 | 6.3 |
| Dulbecco's | 1 | 66.0 | 75.0 | 58.5 | 70.5 | 17.5 | 19.3 | 16.0 | 19.0 |
| | | | | 55.0 | 66.3 | 18.5 | 20.5 | 18.0 | 21.3 |
| | 2 | | | 56.3 | 65.0 | 19.3 | 20.3 | 18.0 | 20.0 |
| | | | | 53.0 | 60.5 | 20.3 | 23.5 | 18.5 | 19.0 |
| | 3 | | | 51.5 | 66.0 | 17.3 | 19.0 | 16.0 | 17.3 |
| | | | | 54.3 | 63.5 | 15.3 | 18.3 | 14.0 | 17.5 |

Anexo 3 Porcentajes de motilidad espermática de la interacción por el efecto Dilutor de la interacción Dilutores por Etapas de evaluación

| Evaluaciones | Dulbecco's | PBS | Tris |
|--------------|------------|-------|-------|
| Refrigerado | 54.77 | 51.80 | 54.80 |
| Descongelado | 18.03 | 6.17 | 14.37 |
| A 2 Semanas | 16.75 | 5.80 | 13.55 |

Anexo 4 Porcentajes de vitalidad espermática de la interacción por el efecto Dilutor de la interacción Dilutores por Etapas de evaluación

| Evaluaciones | Dulbecco's | PBS | Tris |
|--------------|------------|-------|-------|
| Refrigerado | 65.30 | 60.52 | 61.80 |
| Descongelado | 20.15 | 8.63 | 16.27 |
| A 2 Semanas | 19.02 | 7.93 | 14.42 |

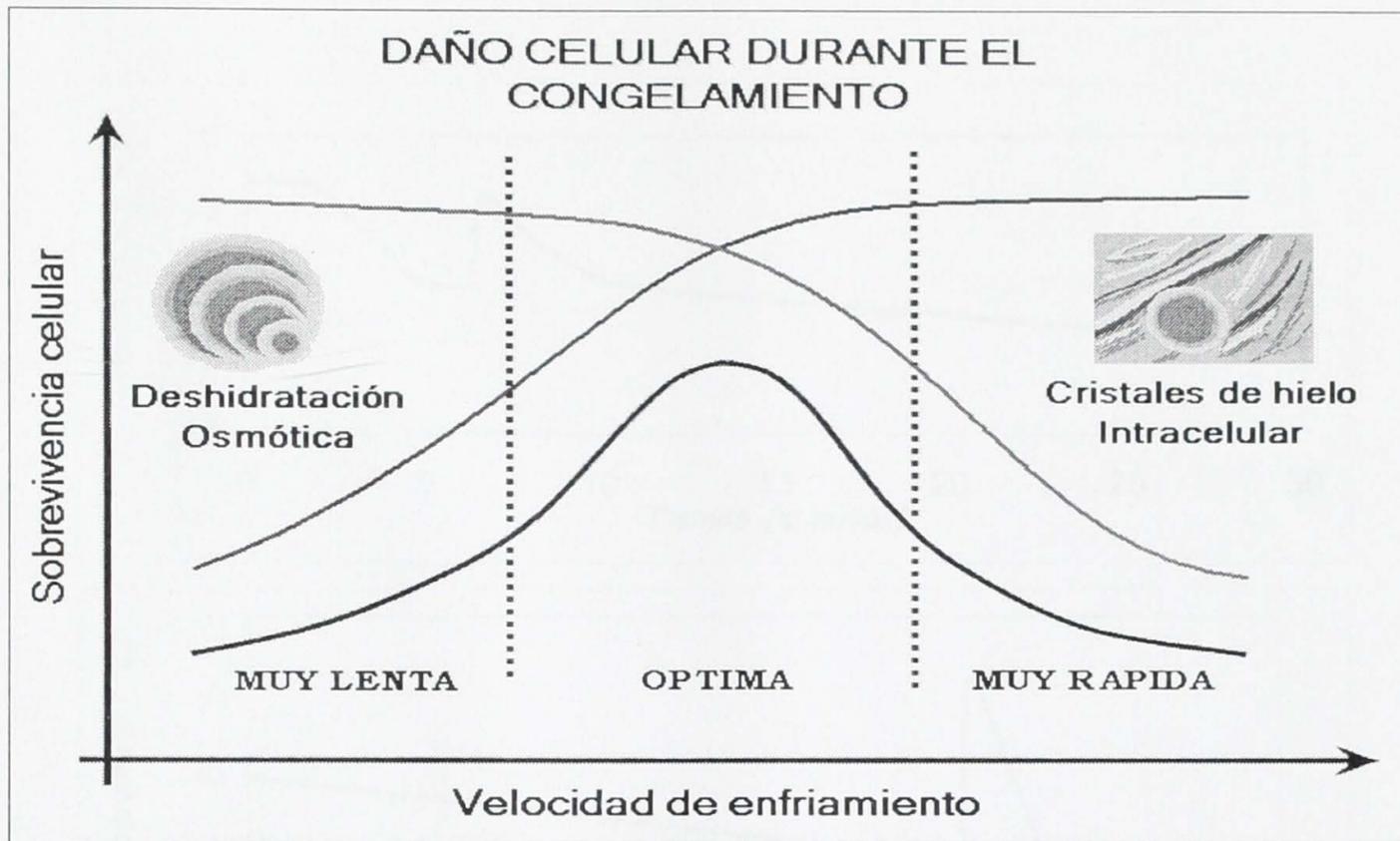
Anexo 5 Porcentajes de vitalidad espermática de la interacción por el efecto de Niveles protocolares por Etapas de evaluación

| Evaluaciones | Niv 1 | Niv 2 | Niv 3 |
|--------------|-------|-------|-------|
| Refrigerado | 62.07 | 62.83 | 62.72 |
| Descongelado | 16.32 | 15.60 | 13.13 |
| A 2 Semanas | 15.13 | 14.38 | 11.85 |

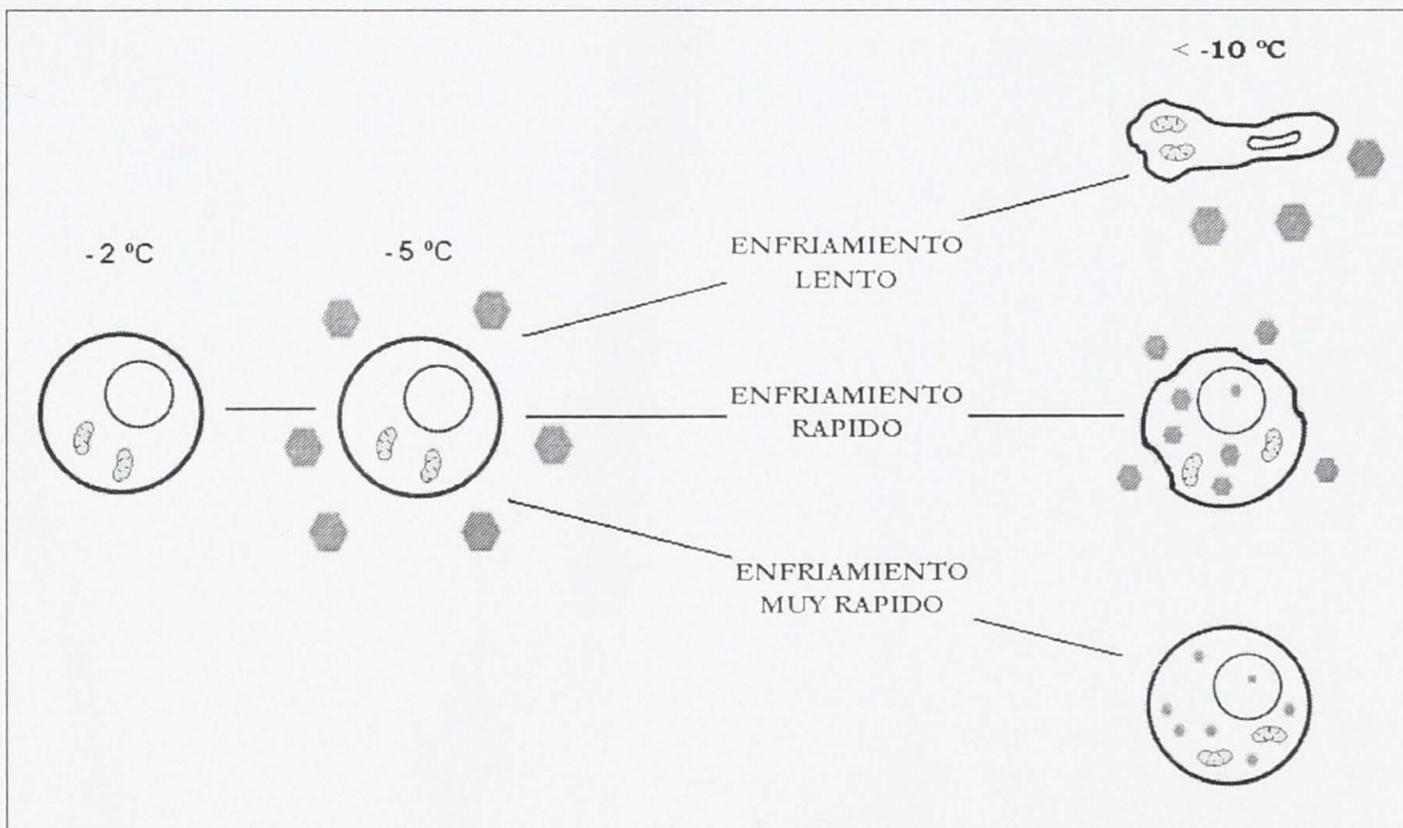
Anexo 6 Promedios de Vitalidad espermática de la triple interacción entre Dilutores por Niveles protocolares por Etapas de evaluación

| Dilutor | Nivel | Evaluación | N | Media | SD |
|---------|-------|------------|---|-------|-------|
| Dul | 1 | Ref | 2 | 68.40 | 2.970 |
| Dul | 1 | Des | 2 | 19.90 | 0.849 |
| Dul | 1 | A 2 Sem | 2 | 20.15 | 1.626 |
| Dul | 2 | Ref | 2 | 62.75 | 3.182 |
| Dul | 2 | Des | 2 | 21.90 | 2.263 |
| Dul | 2 | A 2 Sem | 2 | 19.50 | 0.707 |
| Dul | 3 | Ref | 2 | 64.75 | 1.768 |
| Dul | 3 | Des | 2 | 18.65 | 0.495 |
| Dul | 3 | A 2 Sem | 2 | 17.40 | 0.141 |
| PBS | 1 | Ref | 2 | 57.80 | 3.536 |
| PBS | 1 | Des | 2 | 9.90 | 0.566 |
| PBS | 1 | A 2 Sem | 2 | 8.25 | 1.061 |
| PBS | 2 | Ref | 2 | 63.00 | 0.707 |
| PBS | 2 | Des | 2 | 8.15 | 1.202 |
| PBS | 2 | A 2 Sem | 2 | 8.15 | 1.626 |
| PBS | 3 | Ref | 2 | 60.75 | 0.354 |
| PBS | 3 | Des | 2 | 7.85 | 0.636 |
| PBS | 3 | A 2 Sem | 2 | 7.40 | 1.556 |
| Tris | 1 | Ref | 2 | 60.00 | 4.950 |
| Tris | 1 | Des | 2 | 19.15 | 1.626 |
| Tris | 1 | A 2 Sem | 2 | 17.00 | 1.414 |
| Tris | 2 | Ref | 2 | 62.75 | 0.354 |
| Tris | 2 | Des | 2 | 16.75 | 0.354 |
| Tris | 2 | A 2 Sem | 2 | 15.50 | 0.707 |
| Tris | 3 | Ref | 2 | 62.65 | 0.495 |
| Tris | 3 | Des | 2 | 12.90 | 1.980 |
| Tris | 3 | A 2 Sem | 2 | 10.75 | 0.354 |

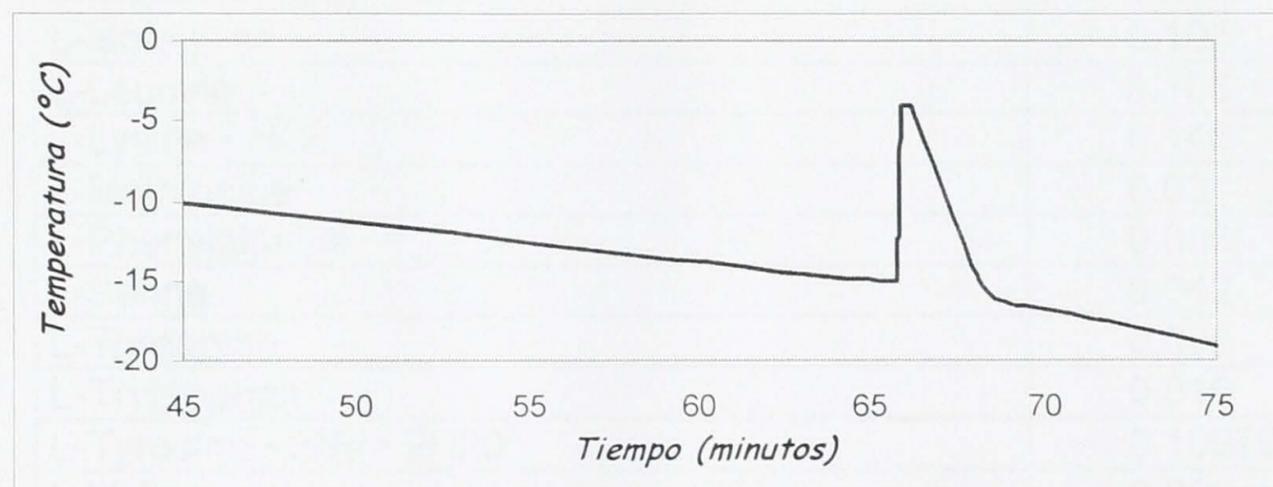
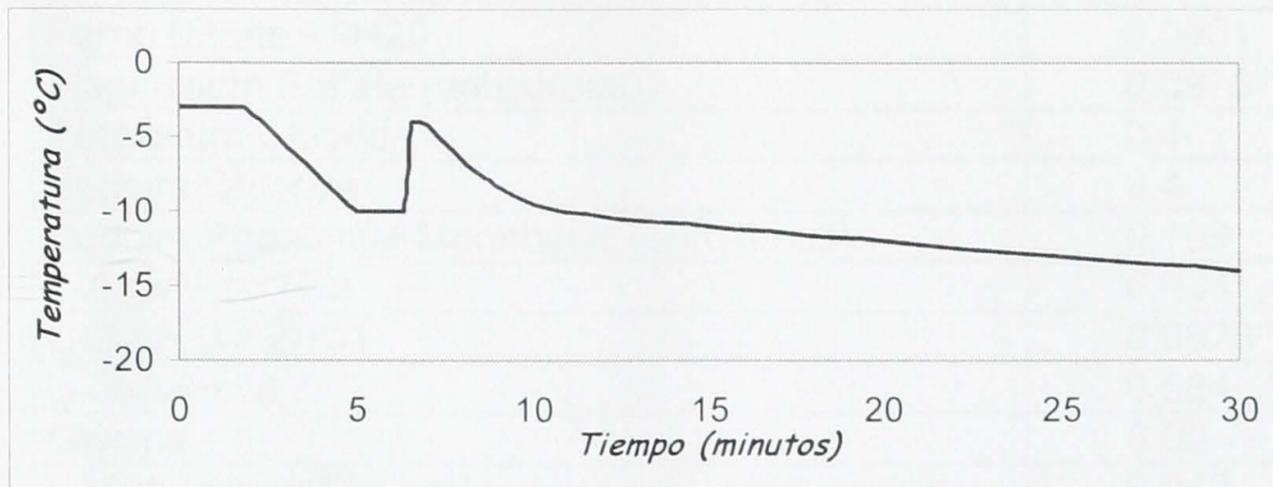
Anexo 7 Curva de sobrevivencia de células según la velocidad de congelación.



Anexo 8 Esquema de los eventos físicos ocurridos en el congelamiento. adaptado de Ciba, 1977.



Anexo 9 Gráfica de temperatura de pajuelas de 0.25 ml durante la congelación



Anexo 10 Componentes del dilutor Dulbecco's (D-7777)

| Componente | g/L |
|--|---------|
| Calcium Chloride • 2H ₂ O | 0.265 |
| Ferric Nitrate • 9H ₂ O | 0.0001 |
| Magnesium Sulfate (anhydrous) | 0.09767 |
| Potassium Chloride | 0.4 |
| Sodium Chloride | 6.4 |
| Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous) | 0.109 |
| L-Arginine • HCl | 0.084 |
| L-Cystine • 2HCl | 0.0626 |
| L-Glutamine | 0.584 |
| Glycine | 0.03 |
| L-Histidine • HCl • H ₂ O | 0.042 |
| L-Isoleucine | 0.105 |
| L-Leucine | 0.105 |
| L-Lysine • HCl | 0.146 |
| L-Methionine | 0.03 |
| L-Phenylalanine | 0.066 |
| L-Serine | 0.042 |
| L-Threonine | 0.095 |
| L-Tryptophan | 0.016 |
| L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O | 0.10379 |
| L-Valine | 0.094 |
| Choline Chloride | 0.004 |
| Folic Acid | 0.004 |
| myo-Inositol | 0.0072 |
| Niacinamide | 0.004 |
| D-Pantothenic Acid (hemicalcium) | 0.004 |
| Pyridoxal • HCl | 0.004 |
| Riboflavin | 0.0004 |
| Thiamine • HCl | 0.004 |
| D-Glucose | 4.5 |
| Phenol Red • Na | 0.0159 |
| Pyruvic Acid • Na | 0.11 |
| Sodium Phosphate | 3.7 |

Fuente: SIGMA Aldrich (2005-2006)

Anexo 11 (Foto) Colección de eyaculado, Método directo con vagina artificial modificada, descrito por Delgado, P. et al., (2000-2003).



Anexo 1 2 (Foto) Materiales para dilución de semen



Anexo 13 (Foto) Dilución del eyaculado con Dulbecco's, Tris y PBS



Anexo 14 (Foto) Almacenado de pajuelas con eyaculado crioconservado



