

Efecto de Tres Niveles de Glicerol y Tiempos de Equilibramiento Sobre la Viabilidad de Espermatozoides de Llama (*Lama glama*) Post-Descongelado*

DELGADO P.*¹, QUISPE Y².

¹ Profesor Investigador Reproducción Animal «Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Pública de El Alto». Bolivia.

² Investigador Independiente, trabajo de tesis en Reproducción Animal «INZ-T-UCB»

INFORMACIÓN DEL ARTICULO

Art. Recibido 15/agosto/2015
Art. Aceptado 20/octubre/2015
online: 30/diciembre/2015

PALABRAS CLAVE:

* Criopreservación
* espermatozoides vivos
* glicerol
* motilidad espermática

RESUMEN

Los intentos de criopreservar semen de camélidos sudamericanos hasta la fecha han dado resultados insatisfactorios, esto debido a características propias del semen, la técnica de colección, la filancia y uso de dilutores, el presente trabajo pretendió determinar el efecto de tres concentraciones de glicerol (6%, 7% y 8%) y tres tiempos de refrigeración (2, 3 y 4 horas) en el porcentaje de motilidad y de espermatozoides vivos de llama pre y post-congelados utilizando el dilutor citrato - yema de huevo-glucosa. Se realizó 42 colecciones de semen por vagina artificial y se destruyó la filancia con extracto de piña. La motilidad espermática y el porcentaje de espermatozoides vivos antes de la congelación no fue afectada por las concentraciones de glicerol ni por los tres tiempos de refrigeración, presentando un promedio general de 64,4% y 71,44% respectivamente. De la misma manera la motilidad espermática y el porcentaje de espermatozoides vivos después de la congelación no fue afectada por las concentraciones de glicerol ni por los tres tiempos de refrigeración, presentando un promedio general de 22,51% y 38,46% respectivamente. Por lo que es indiferente la utilización de 6%, 7% y 8% de glicerol, tampoco influye mantener en equilibrio al semen diluido de llama durante 2, 3 o 4 hrs pues se obtendrá similares resultados.

* Artículo presentado al VII Congreso Mundial en Camélidos Sudamericanos, llevado a cabo en la ciudad de Puno - Perú, los días 28 al 30 de octubre del 2015.

INTRODUCCIÓN

Los intentos de criopreservar semen de camélidos sudamericanos hasta la fecha han dado resultados insatisfactorios, esto debido a características propias del semen, la técnica de colección, la filancia y uso de dilutores, hasta la fecha se reportaron el uso de diferentes dilutores entre los que se encuentran leche descremada, fosfato salino tamponado, glucosa-citrato, yema de huevo-glucosa-citrato, tryladil y tris tamponado. Puntos cruciales como la determinación de la concentración ideal de glicerol como crioprotectores crítico en el establecimiento de protocolos de criopreservación seminal de los camélidos y el tiempo de equilibrio. Por lo expuesto, el presente trabajo pretendió determinar el efecto en el porcentaje de motilidad y de espermatozoides vivos utilizando tres concentraciones de glicerol (6%, 7% y 8%) y tres tiempos de refrigeración (2, 3 y 4 horas) en procesos de congelación y descongelación de semen utilizando el dilutor citrato - yema de huevo - glucosa (CYG).

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de campo y laboratorio se realizó en los predios de la Unidad Académica de Tiahuanaco de la UCB, ubicado a 72 km de la ciudad de La Paz, entre las coordenadas 17° 35' a 18° 17' de Latitud Sur y 68° 20' a 69° 08' de Longitud Oeste y a una altura de 3854 msnm. Se utilizaron 10 llamas machos mayores a 3 a 4 años de edad de la raza Q'ara y 2 llamas hembras vacías. Para el Buffer se pesó 2,120 gr de Citrato de sodio, 0,366 gr de ácido cítrico y 0,8 gr de glucosa (Delgado, 2010). Y se mezcló en 100mL de agua bidestilada. Teniendo ya preparado el buffer se calibró el pH entre 6,5 a 6,6.

Colecta de semen y Pre-dilución del semen con bromelina

Para coleccionar semen se utilizó la técnica desarrollada por Quispe y Delgado (2011), en el cual se estimula por 5 minutos a los machos acercándolos a las hembras winculladas (sujetadas en decumbencia ventral), luego de lo cual se acomoda el maniquí en la parte posterior de la hembra. El tiempo de cópula se desarrolló en un promedio de 15 min. Luego rápidamente se llevó al laboratorio colocándolo en baño maría a 38°C para su posterior evaluación. Para la pre-dilución se utilizó la formulación (de extracto de piña más un dilutor específico) desarrollada por Delgado (2010), para romper la viscosidad del semen de llamas. En una relación de 1:0.75 (1 mL de semen más 750 µL de extracto de piña) todo a 38 °C, para luego realizar la evaluación de las características microscópicas del semen.

Proceso de dilución, empajillado y congelamiento

El semen de acuerdo al volumen coleccionado se diluyó en la fracción A, se lo colocó dentro de un vaso precipitado que contenía 300 ml de agua a una temperatura de 37°C, el cual descendió a 5°C en un tiempo de 2 horas en una cámara de refrigeración. Una vez que la fracción A descendió a temperatura a 5°C, se colocó la fracción B (que contenía el % de glicerol de cada tratamiento) a todos los tratamientos, esto en intervalos de 15 minutos y en cuatro etapas. Administrada ya la fracción

B que contiene el glicerol, se dejó la mezcla final durante el tiempo de equilibrio establecido en el experimento (2, 3 y 4 horas). Luego de estos tiempos establecidos se empajilló el semen en pajuelas de 0.5 mL identificando minuciosamente cada tratamiento. El congelamiento se realizó manualmente por el método de congelamiento a vapor de nitrógeno en una caja tecnopor de acuerdo a la técnica presentada por Delgado (2010) que consiste en colocar las pajuelas con semen en una rampla a 5 cm sobre el nivel de nitrógeno líquido y generar vapores de nitrógeno, durante 15 minutos.

Descongelado de pajillas y evaluación postdescongelado.

Se descongeló las pajillas en agua a 37 °C de temperatura, se evaluó la motilidad y la cantidad de espermatozoides vivos. Para el análisis de datos se utilizó el diseño completamente al azar para cada nivel de glicerol. Utilizando los datos de motilidad espermática y porcentaje de espermatozoides vivos como variables de respuesta.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Determinación del efecto de citrato - yema de huevo - glucosa (CYG) mas 6, 7 y 8 % de glicerol y tres tiempos de equilibramiento (refrigeración) sobre la motilidad y vitalidad espermática pre-congelado de semen de llama.

Los ANVAS y la prueba de medias Duncan para la motilidad espermática antes de la congelación a efecto de las tres concentraciones de glicerol (6, 7 y 8%) y tres tiempos de equilibramiento (2, 3 y 4 horas), demostraron no ser estadísticamente diferentes ($P > 0,05$) en todos los casos tanto para la motilidad como para la vitalidad de espermatozoides de llama. El promedio general de motilidad fue de $64 \pm 10\%$ y un CV de 21%. En cuanto a la vitalidad se determinó un $71.4 \pm 9\%$ con un CV de 19%.

Estornelli, M.C., *et al* (2005), menciona que existe muchos factores que afectan a la viabilidad espermática, entre ellos, dependerá 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 térmico y disminuyen en gran parte a la alteración de la estructura y función de la membrana durante los procesos de refrigeración, congelamiento y descongelamiento.

La vitalidad de los espermatozoides es afectada por el tiempo de refrigeración, ya que las células espermáticas conservadas a 4°C se mantienen inmóviles debido a que la bicapalipídica de la membrana celular se solidifica, pero siguen su actividad metabólica en las mitocondrias produciendo ATP gracias al ciclo de Krebs, a partir del ácido cítrico y de la glucosa, que contiene el dilutor CYG con 6, 7 y 8% de glicerol.

Determinación del efecto de citrato - yema de huevo - glucosa (CYG) más 6, 7 y 8 % de glicerol y tres tiempos de equilibramiento (refrigeración) sobre la motilidad y vitalidad espermática post-descongelado de semen de llama

EFECTO DE TRES NIVELES DE GLICEROL Y TIEMPOS DE EQUILIBRAMIENTO SOBRE LA VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES DE LLAMA (LAMA GLAMA) POST-DESCONGELADO

Los ANVAS y medias Duncan para la motilidad espermática por efecto de tres dilutores (1, 2 y 3) y tres tiempos de refrigeración (2, 3 y 4 horas) post-descongelados, no muestran diferencia estadística significativa ($P > 0,05$). El promedio general de motilidad post-descongelado fue de $42.5 \pm 7\%$ y un CV de 34.5%. En cuanto a la vitalidad post-descongelado se determinó un $58.45 \pm 9\%$ con un CV de 35 %.

Watson, P. (2000), señala que la refrigeración y la congelación son acontecimientos que pueden conducir a la muerte celular o bien alteraciones funcionales del espermatozoide. Las lesiones causadas en la membrana y en los distintos orgánulos del espermatozoide, derivan de dos principales motivos, de estrés de la criopreservación, las alteraciones de la temperatura y la formación y disolución de los cristales de hielo. Si bien no existen estudios sobre la composición química de la membrana del espermatozoide de camélidos, los estudios realizados sobre criopreservación indicarían que es una de las especies que tiene menos probabilidad de resistir el daño durante el proceso de enfriamiento (Santiani, *et al.*, 2003).

Bravo, P. W., *et al.*, (1996), usando semen de alpaca encontró un porcentaje de motilidad post-descongelamiento de 46,7% y en llama de 45% y usando crioprotectores como el glicerol al 7% y el mismo dilutor utilizado en la presente investigación ayudo a conservar una motilidad de 42 %. Aller, J., *et al.*, (2003) utilizando 6% de glicerol encontró 20,4% de motilidad.

La sobrevivencia de los espermatozoides a la congelación, depende del tamaño de la célula, relación volumen superficie, permeabilidad al agua, temperatura, motivo por el cual es difícil extrapolar procedimientos de congelación de semen de una a otra especie, entonces para diferentes tipos de células existe una velocidad de enfriamiento diferente (Boggio, J.C., 2003).

El glicerol afecta directamente en las membranas espermáticas provocando daño celular o la infertilidad espermática. Por lo cual es importante evitar estos efectos, ya que cual existen concentraciones de glicerol para cada tipo de espermatozoides, pero autores como Herrera *et al* (2008) mencionan que los rangos óptimos de glicerol están entre los 6 a 9%.

CONCLUSIONES

El uso de CYG mas glicerol en 6%, 7% y 8% de glicerol y un tiempo de equilibrio entre 2, y 4 horas, arroja un porcentaje de espermatozoides vivos y motiles relativamente adecuado para trabajos de posteriores como la inseminación o la fertilización in vitro.

BIBLIOGRAFÍA

Aller, J.F., Rebuffi, G.E., Cancino, A.K. y Alberio, R.H., 2003. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). Arch. Zootec. 52: 15-23.

Boggio, J.C., 2003. Avances en Transferencias de embriones y biotecnología. Capítulo 8. Universidad Austral De Chile

Bravo, PW, Ordoñez C, Alarcón V. 1996. Processing and freezing of semen of alpacas and llamas. In Proceedings of the 13th International Congress on Animal Reproduction, Sydney, Australia. Pp. P2-3 [Abstract].

Delgado, P., 2010. Manual de Procedimientos de laboratorio para colección procesamiento y cultivo in vitro de gametos. 1ra ed. La Paz: INZ-T-UCB.

Estornelli, M.C.; Tittarelli CM.; Savignone CA.; Stornelli MA., 2005. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal-trabajo de revisión

Quispe, C. Delgado, P, 2011. RevInvZoot. Bolivia. Desarrollo de tres protocolos de colección de semen en llamas (lama glama) en el departamento de la paz -Tesis de grado Universidad Católica Boliviana «San Pablo» UAC – Tiahuanacu.

Santiani, 2003. Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis para obtener el grado de Magíster en Ciencias mención en Biología de la reproducción. Facultad de Medicina-Universidad de la Frontera. Temuco-Chile *Sci*60-61: 481-492.

Watson, 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim. Repro. Sci. 60-61, 481-492.

Herrera E., Castro L. y Chacón J., 2008. Evaluación del efecto del glicerol en el congelamiento de semen canino, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

