



Efecto de seis sustratos energéticos sobre el tiempo de la viabilidad espermática del semen de Alpaca (*Vicugna pacos* L.)

Effect of six energetic substrates on the time of sperm viability of the semen of Alpaca (*Vicugna pacos* L.)

Paxipatty-Quispe Víctor Abdón^{1*}, Loza-Murguía Manuel Gregorio^{1,2,3}, VINO-NINA Nicolasa Lourdes¹, Chura-Limachi Felipe¹, Gonzales-Vargas Víctor Efraín¹, Delgado-Callisaya Pedro Ángel¹

Datos del Artículo

¹ Universidad Católica Boliviana San Pablo-UCBSP. Unidad Académica Cam pesina Tiahuanacu UAC-T. Ingeniería Zootécnica. Km 74. Carretera Internacional La Paz-Desaguadero. Tel 591-2-2895100. La Paz, Estado Plurinacional de Bolivia.

² Universidad Católica Boliviana San Pablo-UCBSP. Unidad Académica Campesina Carmen Pampa-UAC-CP. Ingeniería Agronómica. Coroico-Nor Yungas-La Paz, Estado Plurinacional de Bolivia. Tel +591(2)8781991.

³ Departamento de Enseñanza e Investigación en Bioquímica & Microbiología-DEI&BM. Unidad Académica Campesina Carmen Pampa-UAC-CP.

*Dirección de contacto:

Universidad Católica Boliviana San Pablo-UCBSP. Unidad Académica Campesina Tiahuanacu UAC-T. Ingeniería Zootécnica. Km 74. Carretera Internacional La Paz-Desaguadero.

Victor Abdón Paxipatty-Quispe
E-mail address : abdon.paxi@gmail.com

Palabras clave:

Espermatozoides, sustratos energéticos, viabilidad, Alpaca.

J. Selva Andina Anim Sci.
2017; 4(1):38-58.

Historial del artículo.

Recibido abril, 2016.
Devuelto junio 2016.
Aceptado noviembre, 2016.
Disponible en línea, abril, 2017.

Editado por:
**Selva Andina
Research Society**

Resumen

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la UAC Tiahuanacu, provincia Ingavi del departamento de La Paz, dependiente de la Universidad Católica Boliviana San Pablo, cuyo objetivo fue evaluar el efecto de seis sustratos energéticos sobre el tiempo de viabilidad espermática del semen de alpaca (*Vicugna pacos* L.). El semen colectado fue diluido y conservado en seis diferentes sustratos energéticos (TCG, TCAP, TCF, TG, TAP y TF), una Temperatura de 35 °C, evaluando cada 2 h, empleando para su análisis el Diseño Completamente al Azar (P<0.05). Obteniendo un promedio de volumen de semen 1.5±0.7 mL, filancia 5.1±1.5, pH 7.2±0.5, motilidad y vitalidad de 89.0 y 95.0 % y concentración 82.0x10⁶ Epz/mL. El sustrato energético (SE) TCG logró mantener una motilidad de 61.0 y 66.0 % de vitalidad conservado durante 8 horas, en tal sentido se recomienda utilizar el SE TCG, mismo que mantuvo por mayor tiempo (horas) a los espermatozoides viables para la IAF.

© 2017. Journal of the Selva Andina Animal Science. Bolivia. Todos los derechos reservados.

Abstract

The research was carried out in the Laboratory of Reproductive Biotechnology of the UAC Tiahuanacu, Ingavi province of the Department of La Paz, dependent of the Bolivian Catholic University, whose objective was to evaluate the effect of six energetic substrates on the sperm viability time of the alpaca semen (*Vicugna pacos* L.). The collected semen was diluted and stored in six different energy substrates (TCG, TCAP, TCF, TG, TAP and TF), a T ° of 35 °C, evaluating every 2 hours, using the Completely Random Design (P < 0.05). Obtaining a mean volume of semen 1.5 ± 0.7 mL, filament 5.1 ± 1.5, pH 7.2 ± 0.5, motility and vitality of 89.0 and 95.0% and concentration 82.0x10⁶ Epz / mL. The energetic substrate (SE) TCG managed to maintain a motility of 61.0 and 66.0% of vitality preserved for 8 hours, in that sense it is recommended to use the SE TCG, which maintained for a longer time (hours) the viable spermatozoa for LAI.

Key words:

Spermatozoids,
energy substrates,
viability,
Alpaca.

© 2017. Journal of the Selva Andina Animal Science. Bolivia. All rights reserved.

Introducción

La demanda de fibras naturales de alta calidad así como de carnes con un bajo contenido de colesterol motiva la aplicación de biotecnologías reproductivas en los Camélidos Sudamericanos (CSA). En muchas especies domésticas la inseminación artificial (IA) constituye la principal herramienta para la diseminación de genes de alta calidad siendo el método de elección para mejorar la genética de los establecimientos ganaderos. Sin embargo, esta técnica no se utiliza rutinariamente en los CSA debido a los resultados obtenidos de la IA con semen criopreservado han sido bastante desalentadores (Bravo 2000, Vaughan *et al.*, 2003, Aller *et al.* 2003, Huanca *et al.* 2007, Giuliano *et al.* 2012). Esto motiva a la aplicación de diferentes técnicas que permitan evaluar los efectos que sufren los espermatozoides crio preservados.

La colección de semen en CSA representa un problema debido a la naturaleza del semen y la duración de la copula, se han desarrollado diferentes métodos de colección, los más utilizados es la vagina artificial (Sumar & Leyva 1981), dicho semen necesita ser degelificado utilizando enzimas (Bravo *et al.* 1999), una alternativa a este método es la colección de espermatozoides (epz) por desviación del conducto deferente (Paricahua 2001), los epz colectados mediante esta técnica son de fácil manipulación y no necesitan degelificación.

Las alpacas y llamas, son consideradas estacionales en su actividad reproductiva en su hábitat natural, los nacimientos se producen en la época de lluvia

(diciembre a marzo) cuando el forraje es, mantenido el estado corporal de la madre y los machos son separados de las tropas de hembras, la actividad ovárica se presenta durante todo el año, La mayoría de los nacimientos registrados se producen en esa temporada. El factor medio ambiental tiene gran influencia, sobre la actividad sexual del macho, la estación de lluviosa y temperatura son favorables para una mayor disponibilidad de alimentos. Cuando se mantienen juntos tanto machos y hembras, las pariciones siempre se circunscriben a la época de lluvias, lo que implica que una asociación continua inhibe de alguna forma la actividad sexual (Gonzales 2010).

El efecto de la repetición de colección de semen usando el método de la vagina artificial, realizando hasta tres colecciones diarias por un periodo de 12 días seguidos, los resultados obtenidos indican que las características más afectadas por la frecuencia de colección fueron la concentración de epz, descendiendo significativamente en la tercera colección, así mismo el porcentaje de anomalías en la cola se incrementa, pero la motilidad, vitalidad y el porcentaje de epz normales no son afectadas, existiendo diferencias significativas en las características al realizar las comparaciones entre individuos (Bravo 2000).

Las características especiales que presentan los CSA en cuanto a su reproducción los hacen especies *sui-generis*, por lo que es necesario diseñar técnicas de colección de semen para dichas características como

el prolongado tiempo de copula, eyaculación intracornual y continua, la extrema viscosidad del semen, por lo que el objetivo de la presente investigación fue, evaluar el efecto de seis sustratos energéticos sobre el tiempo de viabilidad espermática del semen de alpaca (*Vicugna pacos* L.)

Materiales y métodos

Ubicación geográfica. El trabajo de investigación se realizó en los predios de la Unidad Académica Campesina Tiahuanacu, que se encuentra en la Provincia Ingávi del departamento de La Paz, a 72 km de la sede de gobierno, 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 3883 msnm. (PDM de Tiahuanacu 2011).

Material biológico. En la investigación se utilizó 13 alpacas machos de las categorías de B a D y una alpaca hembra, ambos de la raza Huacaya, de 2 a 6 años de edad, fueron evaluados fenotípicamente bajo los siguientes parámetros reproductivos: tamaño testicular de 3 cm de diámetro menor y un diámetro mayor de 6 cm, de condición corporal regular (3 a 3.5) y libre de adherencia de pene prepucial, se les realizó la desparasitación con PARAMEC 20LA, administrado vía intramuscular a una dosis de 2 mL/100 Kg de PV, y posteriormente se administró FOSFOVIT como fuente de fosforo para coadyuvar a la espermatogénesis.

Las 13 alpacas machos admitidos para la investigación fueron adiestrados durante un mes, en ese tiempo solo 3 aceptaron al método de colección con vagina artificial modificada con desviación de pene, la selección se realizó de acuerdo a las características macro y microscópicas del semen de cada reproductor, solo un macho presentó buenas caracte-

rísticas seminales, realizándose la investigación con el mismo.

Colecta del semen. La colecta fue con la vagina artificial con desviación de pene, método que tuvo una aceptación del 60 % de los 13 machos, de los que solo uno presentó características micro y macroscópicas de semen ideales para esta investigación, la colecta se realizó 2 veces en la semana descrito por (Bravo 2000).

Para la colecta de semen se extendió una lona (tela) con el objetivo de reducir la contaminación en el momento de la colecta, sujetando a la alpaca hembra y colocándolo sobre la lona, seguidamente se realizó la estimulación al macho dando 4 a 6 vueltas alrededor de la alpaca hembra sujeta (*Wincullada*). Las colectas respectivas se realizaron de 15 a 25 min (duración de la cópula) e inmediatamente se llevó el eyaculado al laboratorio. El eyaculado se colocó en baño maría a 35 °C, y se siguió con la evaluación macroscópica y microscópica del semen de alpaca.

Evaluación macroscópica. La evaluación del color de los eyaculados, se realizaron de forma directa del tubo colectores, tomándose en cuenta las tonalidades básicas del blanco, como él: blanco lecho, blanco cremoso, blanco cristalino y blanco translucido (Huanca *et al.* 2011).

El volumen proveniente de la colecta de semen por el método de vagina con desviación de pene, posterior a la colecta realizó la lectura inmediata del tubo colectores destacando el volumen en unidades de mL.

Para la filancia, 10 µL de semen con la micropipeta del vaso colector, posteriormente se puso sobre la base del filanciometro que está en una superficie horizontal, seguidamente se levantó la muestra con una aguja N° 18, ubicando la altura en el momento

cuando se fracciona el fluido en dos y dicha medida se expresó en cm.

Para la valoración del pH del eyaculado, se evaluó con el pH metro digital con un rango precisión de 0.001 a una temperatura de 25 °C con tres repeticiones de cada colecta.

Pre-dilución del semen con el extracto de piña. Se adicionó 25 % de extracto de piña en relación al eyaculado, homogenizando suavemente en un tubo falcón de 14 mL, esta dilución se realizó con la finalidad de romper la viscosidad del semen, para luego realizar la evaluación de las características microscópicas.

Dilución del semen con los sustratos energéticos. La dilución se realizó a una relación 50:950 (semen-SE), 10 µL de semen pre-diluido, con una micropipeta, incorporando a 6 micropocillos por cada sustrato energético, posteriormente adicionando 10 µL de sustratos energéticos, con sus respectivas repeticiones.

Evaluación microscópica. La concentración espermática (EPZ) del semen, con una micropipeta 10 µL de semen, colocando sobre la cámara Neubauer y cubriéndolo con el cubre objeto, dejando reposar durante un tiempo de 5 min y luego se realizó el conteo correspondiente de células espermáticas. La concentración espermática se determinó con la siguiente ecuación (Huanca *et al.* 2011).

$$\text{Concentración de EPZ /mL} = \text{Epz} \times 25 \times 100 \times 10000.$$

Dónde:

Epz= Promedio de espermatozoides contados.
25 = N° de cuadrantes contados.
100 = Factor de dilución.

Motilidad espermática. La evaluación se realizó en el microscopio con platina térmica y los materiales de manipulación fueron atemperados a 36 a 38 °C, posterior a ello, con una micropipeta se extrajo 10 µL pre-diluido, colocando sobre un porta objeto y

cubriéndolo con el cubre objeto, la lectura se realizó en un microscopio a 40X, contando los espermatozoides del campo que se observan, valorando subjetivamente los epz en movimiento de forma rectilínea. El porcentaje de motilidad espermática se obtuvo en la siguiente ecuación (Blanco 2010).

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

Donde:

n= Número de espermatozoides móviles.
N= Número de espermatozoides contados.

Vitalidad espermática. 10 µL de semen pre-diluido y 10 µL de la solución de eosina y nigrosina, en un porta objeto, se homogenizó suavemente con la punta de la pipeta durante 15 seg, se realizó el frotis, se dejó 2 a 5 min para eliminar la humedad, la lectura de los epz teñidos y no teñidos. El número de epz vivos se determinó con la siguiente fórmula (Gonzales 2005).

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

Donde:

n= Número de espermatozoides sin teñir.
N= Número de espermatozoides contados.

Evaluación del efecto de seis sustratos energéticos sobre el tiempo de viabilidad espermática del semen de alpaca (Vicugna pacos L.). Las evaluaciones se valoraron cada 2 h, describiendo las características del % de motilidad y vitalidad espermática, hasta lograr una viabilidad espermática con mayor tiempo de conservación en cualquier SE, apto para a inseminación artificial (tabla 1).

Análisis de resultados. Las características macro y microscópicas fueron organizados y analizados bajo los parámetros como: Promedio, DS, CV % y los resultados máximos y mínimo de los datos obtenidos, (Aplicando la estadística descriptiva con Microsofl Exel-2010).

Tabla 1 Composición de los sustratos energéticos post-pesaje

	Insumos	Sustratos energéticos					
		TCF	TCG	TCAP	TF	TG	TAP
Buffer	TRIS (g)	0.76	0.76	0.76	0.76	0.57	0.76
	Ácido cítrico (g)	0.34	0.34	0.34	-	-	-
	Fructosa (g)	0.25	-	-	0.56	-	-
	Glucosa (g)	-	0.25	-	-	0.5	-
	Acido pirúvico (g)	-	-	0.12	-	-	0.28
Sustrato	Buffer (%)*	80	80	80	80	80	80
	Yema de huevo (%)	20	20	20	20	20	20
Estandarización del pH		7.06	7.04	7.03	7.01	7.07	7.03

Para la evaluación del efecto de los sustratos energéticos sobre la motilidad y vitalidad espermática, se diseñó de acuerdo a los factores de estudio:

Tris-Citrato-Glucosa (TCG), Tris-Citrato-Fructosa (TCF), Tris-Citrato-Acido Pirúvico (TCAP), Tris-Glucosa (TG), Tris-Fructosa (TF), Tris-Acido Pirúvico (TAP)

Cuyas variables de respuestas fueron. Motilidad espermática. (%), Vitalidad espermática. (%), Las respectivas evaluaciones por cada SE, se realizaron con 6 repeticiones correspondientemente por cada hora de evaluación. En este contexto para la evaluación de los datos obtenidos, se empleó el modelo

aditivo lineal de Diseño Completamente al Azar (DCA).

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

y_{ij} = Variable de respuesta.

μ = Media general del experimento.

α_i = Efecto del i-ésimo sustrato energético a 0, 2, 4, 6, 8 y 10 h.

ε_{ij} = Error experimental.

Pruebas de promedios. Las diferencias estadísticas fueron analizadas mediante la prueba de comparación de medias DUNCAN a un nivel de significancia del 5 % ($\alpha = 0.05$).

Resultados

Tabla 2 Evaluación de las características macroscópicas y microscópicas del semen de alpaca

Características macroscópicas	n	Promedio	DS ±	CV	Max	Min
Color	44	Blanco lechoso	-	-	-	-
Volumen (mL)	44	1.5	0.7	4.7	2.5	1.5
Filancia (cm)	44	5.9	1.5	2.5	6.0	1.8
pH	44	7.2	0.5	0.7	7.4	6.7
Características microscópicas						
Motilidad espermática (%)	44	89.0	2.8	0.3	94.0	86.0
Vitalidad espermática (%)	44	95.0	5.2	0.5	92.0	78.0
Concentración espermática ($\times 10^6$)	44	82.0	19.2	2.3	130.0	62.0

Tabla 3 Análisis de varianza de motilidad espermática conservado a 0 horas

Fuente de variación	GL	SC	CM	Valor-F	Pr > F
Sustratos energéticos	6	93.61	15.6	2.04	0.1282
Error	14	107.33	7.66		
Total	20	93.61			

CV	MEDIA	DS
3	93.04	2.7

Tabla 4 Análisis de varianza de motilidad espermática conservado a 2 horas

Fuente de variación	GL	SC	CM	Valor-F	Pr > F
Sustratos energéticos	6	3468.95	578.16	379.42	0.0001
Error	14	21.33	1.5		
Total	20	3490.28			

CV	MEDIA	DS
3	66.0	1.23

Figura 1 Comparación del efecto de seis sustratos energéticos sobre el % de motilidad espermática a 2 horas de conservación

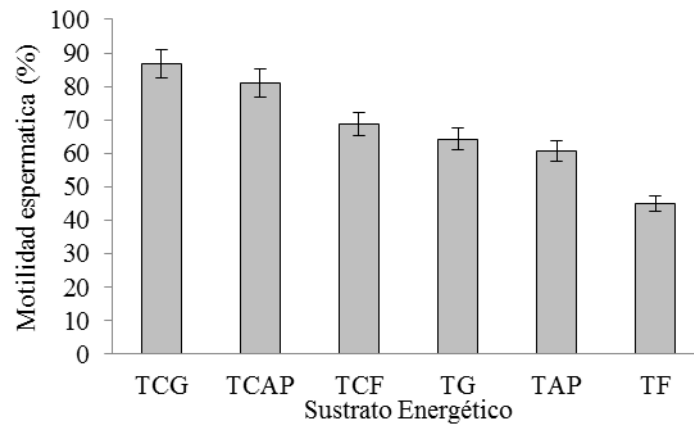


Tabla 5 Análisis de varianza de motilidad espermática conservado a 4 horas

Fuente de variación	GL	SC	CM	Valor-F	Pr > F
Sustratos energéticos	6	9401.9	1566.98	216.49	0.0001
Error	14	101.33	7.24		
Total	20	9503.23			

CV	MEDIA	DS
5.22	51.52	2.69

Figura 2 Comparación del efecto de seis sustratos energéticos sobre el % de motilidad espermática a 4 horas de conservación

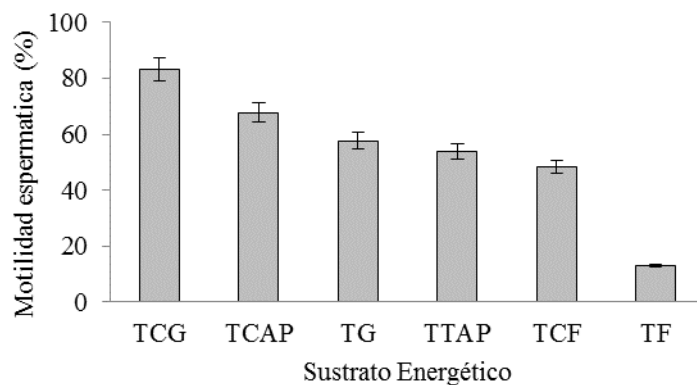


Tabla 6 Análisis de varianza de motilidad espermática conservado a 6 horas

Fuente de variación	GL	SC	CM	Valor-F	Pr > F
Sustratos energéticos	6	1026.28	1737.71	217.21	0.0001
Error	14	112.0	8		
Total	20	10538.28			

CV	MEDIA	DS
8.25	34.28	2.83

Figura 3 Comparación del efecto de seis sustratos energéticos sobre el % de motilidad espermática a 6 horas de conservación

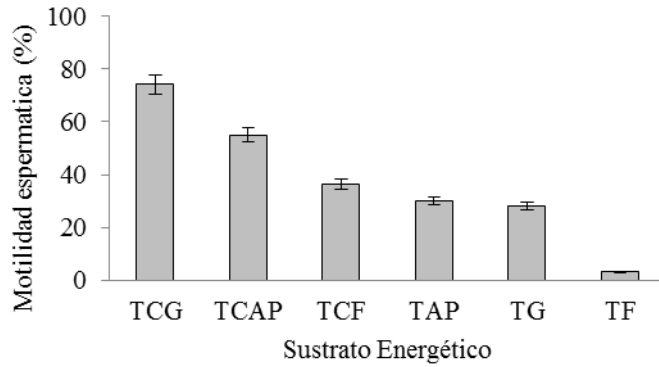


Tabla 7 Análisis de varianza de motilidad espermática conservado a 8 horas

Fuente de variación	GL	SC	CM	Valor-F	Pr > F
Sustratos energéticos	6	8554.28	1425.71	369.63	0.0001
Error	14	54.0	3.86		
Total	20	8608.28			

CV	MEDIA	DS
8.64	22.71	1.96

Figura 4 Comparación del efecto de seis sustratos energéticos sobre el % de motilidad espermática a 8 horas de conservación

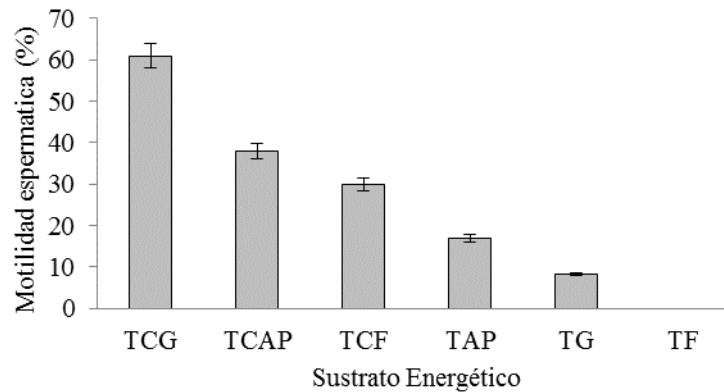


Tabla 8 Análisis de varianza de motilidad espermática conservado a 10 horas

Fuente de variación	GL	SC	CM	Valor-F	Pr > F
Sustratos energéticos	6	5382.28	897.04	362.27	0.0001
Error	14	34.67	2.48		
Total	20	5416.95			

CV	MEDIA	DS
10.5	14.95	1.57

Figura 5 Comparación del efecto de seis sustratos energéticos sobre el % de motilidad espermática a 10 horas de conservación

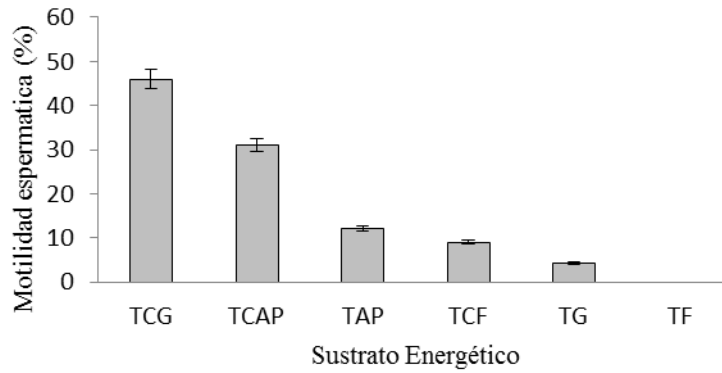


Figura 6 Comportamiento del efecto de 6 SEs sobre el % de motilidad espermática evaluados durante 10 horas

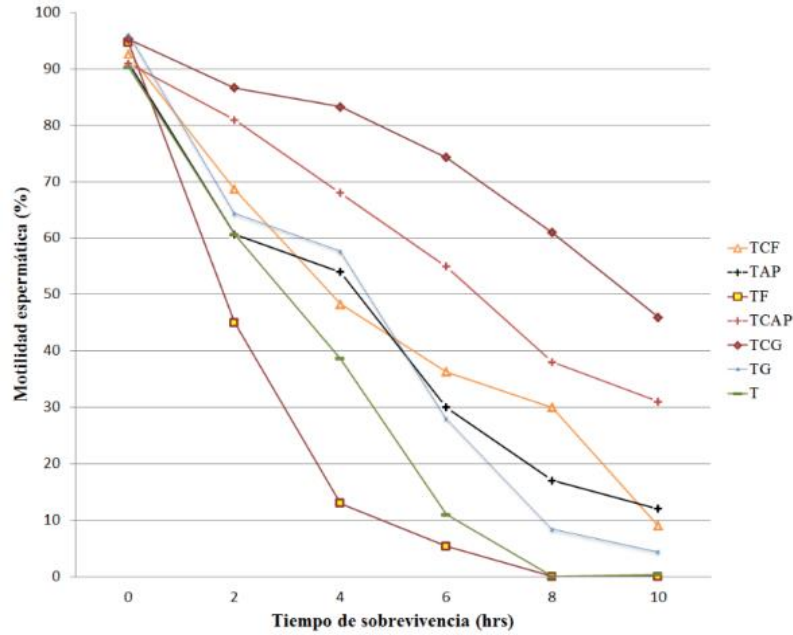


Tabla 9 Análisis de varianza de vitalidad espermática conservado a 0 horas

Fuente de variación	GL	SC	CM	Valor-F	Pr > F
Sustratos energéticos	6	16.28	2.71	1.12	0.4008
Error	14	34.0	7.66		
Total	20	50.28			

CV	MEDIA	DS
3	95.0	1.56

Tabla 10 Comparación de medias Duncan de la vitalidad espermática conservado a 0 horas

Agrupamiento DUNCAN	Promedio / SE	Tipo de sustrato energético (SE)
A	97.0	TCG
A	96.0	TG
A	95.0	TF
A	95.0	TCF
A	95.0	TCAP
A	94.0	TAP

Tabla 11 Análisis de varianza de vitalidad espermática conservado a 2 horas

Fuente de variación	GL	SC	CM	Valor-F	Pr > F
Sustratos energéticos	6	1700.95	283.49	17.11	0.0001
Error	14	232.0	16.57		
Total	20	1932.0			

CV	MEDIA	DS
5.5	73.38	4.07

Figura 7 Comparación del efecto de seis sustratos energéticos sobre el % de vitalidad espermática a 2 horas de conservación

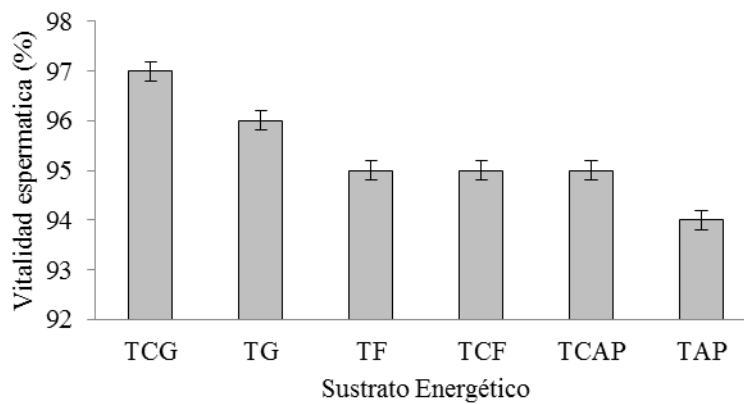


Tabla 12 Análisis de varianza de vitalidad espermática conservado a 4 horas

Fuente de variación	GL	SC	CM	Valor-F	Pr > F
Sustratos energéticos	6	226.0	16.14	48.07	0.0001
Error	14	226.0	16.14		
Total	20	4881.81			

CV	MEDIA	DS
6.4	62.76	4.02

Figura 8 Comparación del efecto de seis sustratos energéticos sobre el % de vitalidad espermática a 4 horas de conservación

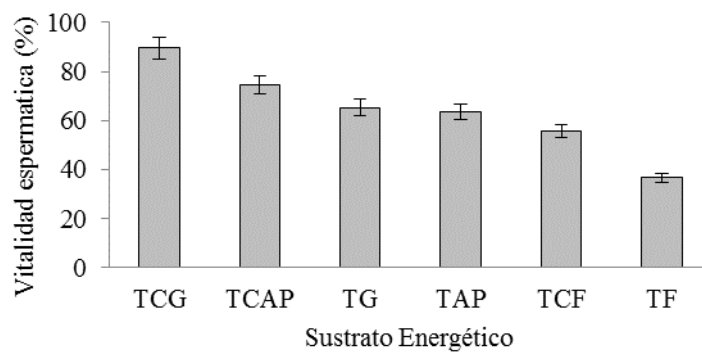


Tabla 13 Análisis de varianza de la vitalidad espermática conservado a 6 horas

Fuente de variación	GL	SC	CM	Valor-F	Pr > F
Sustratos energéticos	6	11218.57	1869.6	350.58	0.0001
Error	14	74.67	5.33		
Total	20	11293.23			

CV	MEDIA	DS
6.5	39.19	2.3

Figura 9. Comparación del efecto de seis sustratos energéticos sobre el % de vitalidad espermática a 6 horas de conservación

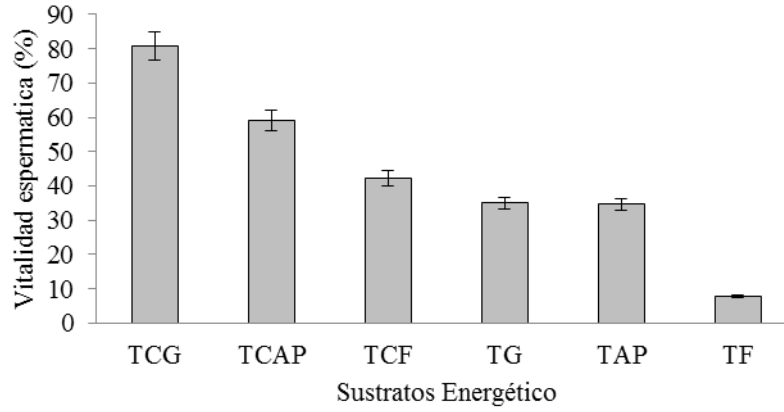


Tabla 14 Análisis de varianza de la vitalidad espermática conservado a 8 horas

Fuente de variación	GL	SC	CM	Valor-F	Pr > F
Sustratos energéticos	6	10458.28	1743.04	703.92	0.0001
Error	14	34.67	2.48		
Total	20	8608.28			

CV	MEDIA	DS
6.7	1.57	26.38

Figura 10. Comparación del efecto de seis sustratos energéticos sobre el % de vitalidad espermática a 8 horas de conservación

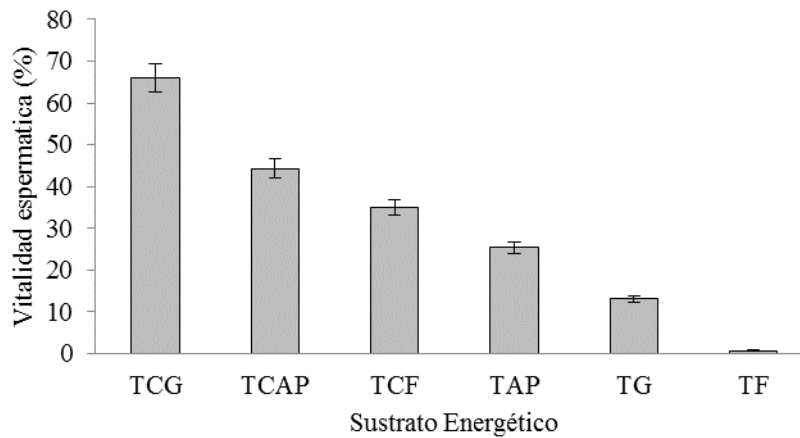


Tabla 15 Análisis de varianza de la vitalidad espermática conservado a 10 horas

Fuente de variación	GL	SC	CM	Valor-F	Pr > F
Sustratos energéticos	6	8680.28	1446.71	1446.71	0.0001
Error	14	14.0	1.0		
Total	20	8694.28			

CV	MEDIA	DS
7.4	19.71	1.0

Figura 11 Comparación del efecto de seis sustratos energéticos sobre el % de vitalidad espermática a 10 horas de conservación

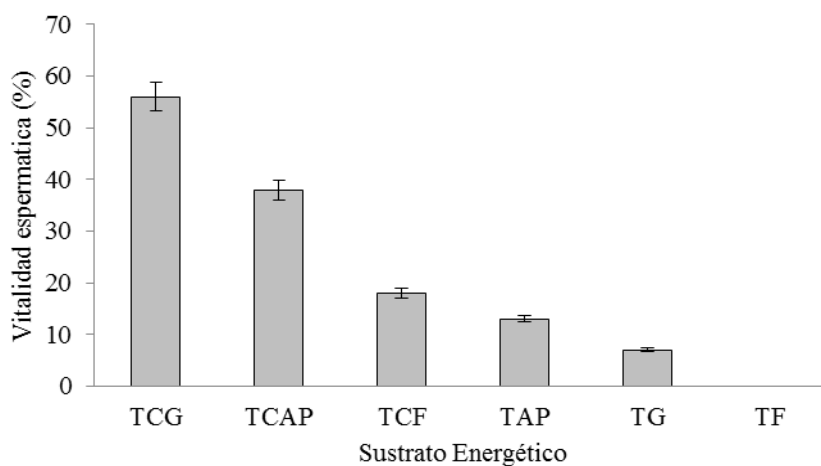
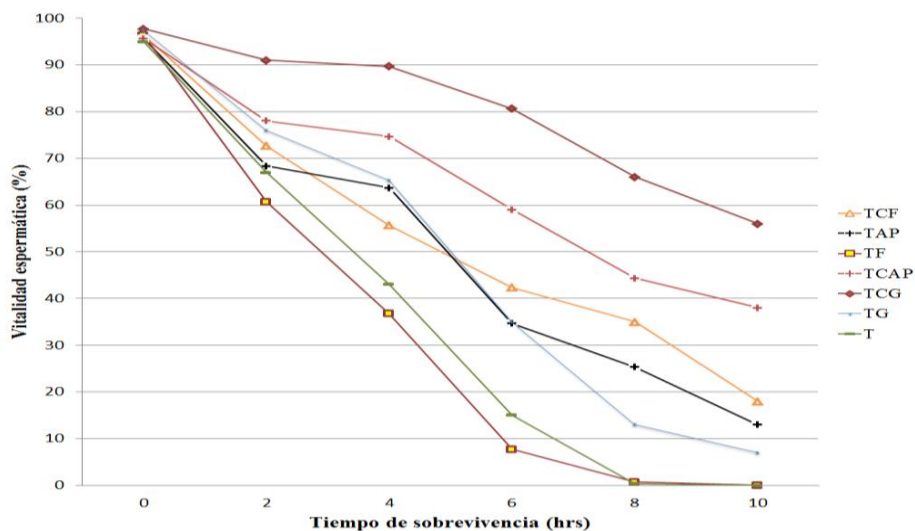


Figura 12 Comportamiento del efecto de 6 SEs sobre el % de vitalidad espermática evaluados durante 10 horas



Discusión

Características macroscópicas y microscópicas del semen de alpaca. En la tabla 2 se muestra los resultados de 44 repeticiones en cuanto a las características macro-microscópicas del semen, color blanco lechoso, volumen 1.5 ± 0.7 mL, filancia de 5.9 ± 1.5 cm y un pH de 7.2 ± 0.5 . En cuanto a las características microscópicas se obtuvo 82×10^6 Ezp/mL de concentración espermática, motilidad espermática individual de 89 %.

(Huanca *et al.* 2011, Dávalos & Olazábal 2002), reportaron un volumen de 1.3 ± 1.2 mL y 2.7 ± 0.8 mL respectivamente, ambos en la época lluviosa. El volumen colectado en la presente investigación se encuentra dentro del rango mencionado por estos autores, la variación de los datos mínimos, puede deberse al método de colección, ya que utilizaron un maniquí de alpaca en tanto el presente trabajo de investigación se utilizó la técnica de desviación de pene con vagina artificial, la filancia del eyaculado (Huanca *et al.* 2011), obtuvieron 1.1 ± 1.2 cm en época lluviosa, mientras que (Huanca *et al.* 2007), reportaron 3.0 ± 0.2 cm, y (Dávalos & Olazábal 2002), obtuvieron 2.5 ± 0.4 cm, que fueron evaluados en la época lluviosa o época de reproducción, de manera que los resultados son menores al presente trabajo de investigación, esto se atribuye a la posible variabilidad de la presión en la vagina artificial y a las características individuales del macho como ser: volumen, filancia, motilidad, concentración espermática, epz normales, anomalías en la cola, y con gota citoplasmática, mencionado por (Huanca *et al.* 2011).

(Huanca *et al.* 2011), mencionan que obtuvieron 45.0×10^6 /mL de concentración espermática, 45.3 % de motilidad y una vitalidad de 51.4 %. (Dávalos & Olazábal 2002 reportaron 57.5×10^6 /mL de concen-

tración espermática, 68.9% de motilidad y una vitalidad de 72.1 % y (Huanca *et al.* 2011) obtuvieron una concentración espermática de 78.6×10^6 /mL, una motilidad de 46.5 y 56.1 % de vitalidad, datos que son inferiores a los obtenidos en la presente investigación que es de 82×10^6 /mL, una motilidad de 89.0 % y una vitalidad de 95.0 %, y son similares a los obtenido por (Huanca *et al.* 2011), y superiores a los de (Dávalos & Olazábal 2002).

Efecto de seis sustratos energéticos sobre el % de motilidad espermática a 0 horas de conservación.

Según el análisis de varianza (tabla 3) para el efecto de 6 SEs, sobre el % de motilidad espermática a 0 horas de conservación mostraron diferencias no significativas ($P=0.1282$) entre sustratos energéticos, con un coeficiente de variación de 3.0 % demostrando que los datos obtenidos son altamente confiables. La célula degrada frente a cualquier compuesto simple en el medio, a una acción de difusión simple, donde la molécula liposoluble penetrará en la célula disolviéndose en los lípidos de la membrana, penetrando en la célula en forma de gases respiratorios, anestésicos, fármacos, entre otros. Describiendo que una ecuación química balanceada entre componentes químicos iniciales como el sustrato y los nuevos componentes químicos como producto formados para una reacción química particular, existe una reversibilidad del producto y sustrato (Peter *et al.* 2008).

El análisis de varianza (tabla 4) por efecto de 6 SEs, sobre el % de motilidad espermática conservado a 2 h, mostraron diferencias altamente significativas ($P=0.0001$) con un coeficiente de variación de 3.0 %, demostrando que los datos son confiables para el su análisis. Correspondientemente a la comparación de medias Duncan ($\alpha=0.05$) a 2 h de conservación (figura 1), para la evaluación del efecto de los tratamientos, sobre el % de motilidad a 2 h de conser-

vación, se observa que el SE con TCG logró conservar un 86.7 % de motilidad espermática, siendo superior a los demás SEs, seguido por TCAP, TCF, TG, TAP y TF, con 81.0, 68.7, 64.3, 60.7 y 45.0 % de motilidad espermática respectivamente.

La variabilidad de la motilidad entre los SEs evaluados a 2 h, los SEs TCG y TCAP, mantiene un proceso secuencial debido que, la glucosa y el ácido pirúvico deben pasar por un proceso de reestructuración de la molécula para ser incorporado en el ciclo del ácido cítrico, mientras que los SEs TAP y TF, tienen una reacción de difusión facilitada, penetrando en la célula, agua, urea, Na, K, fructosa, entre otras moléculas pequeñas, ocurriendo en la célula, un transporte activo primario, la energía procede directamente de la ruptura de la molécula de ATP o de otra molécula energética con fosfatos de alta energía (Peter *et al.* 2008).

Según el análisis de varianza (tabla 5) para el efecto de 6 SEs, sobre el % de motilidad espermática a 4 h de conservación mostraron diferencias altamente significativas ($P=0.0001$) con un coeficiente de variación de 5.22 %, misma que muestra que los datos son confiables.

En la comparación de medias Duncan ($\alpha=0.05$) (figura 2) para la evaluación del efecto de 6 SEs, sobre el % de motilidad espermática a 4 h, se observa que el SE con TCG logró conservar un 83.3 % de motilidad, siendo superior a los demás SEs, seguido por TCAP, TG, TAP, TCF y TF con 67.3, 57.7, 54.0, 48.3 y 13.0 % de vitalidad espermática respectivamente. Al pasar el tiempo los espermatozoides en los SEs TCF, TF y el testigo, por efecto de la temperatura los espermatozoides van acelerando su metabolismo celular y generando más ATPs y liberando en cada ciclo dos moléculas de CO_2 , esto hace que los epz al transcurrir el tiempo perdían la moti-

lidad individual en caso de los SE y en cambio el testigo, tiene nutrientes necesario para pasar el tracto peniano y almacenarse en un corto tiempo en la tracto genital de la hembra. A comparación de los SEs TCG, TCAP y TG, por ser moléculas complejas que antes de ingresar al ciclo deben pasar por un proceso de descarboxilación y oxidación para generar otras reacciones, hecho que permite que los espermatozoides realicen mejor su metabolismo (Peter *et al.* 2008).

Para el análisis de varianza (tabla 6) para el efecto de 6 SEs, sobre el % de motilidad espermática a 6 h de conservación, mostraron diferencias altamente significativas ($P=0.0001$) con un coeficiente de variación de 8.25 %, misma que indica que los datos son confiables.

La evaluación de medias Duncan ($\alpha=0.05$) a 6 h de conservación (figura 3) para la evaluación del efecto de los 6 SEs, sobre el % de motilidad conservado a 6 h, se observa que el SE con TCG logró mantener un 74.3 % de motilidad espermática, siendo superior a los demás SEs, seguido por TACP, TCF y TAP, con 55.0, 36.3 y 30.0 % de motilidad, mientras que los SEs TG y TF solo lograron conservar 28.0 y 3.0 % de motilidad espermática correspondientemente.

El metabolismo glicolítico que desarrolla el espermatozoide, hace que el pH intracelular disminuya y el metabolismo celular quede reducido, el Tris en este caso puede regular el pH en un rango más amplio y no es dependientes de la temperatura, este componente tamponador está entre 6.8 a 7.2, esto no se estabiliza hasta las 8 - 9 min en el medio y en la célula ocurre por efecto del equilibrio del medio, la disponibilidad de los nutrientes es más fácil de asimilar, efecto por el cual la fructosa, son más fácil de incorporar a su metabolismo que a comparación de

con la glucosa y el ácido pirúvico (Peter *et al.* 2008).

El análisis de varianza (tabla 7) para el efecto de 6 SEs, sobre el % de motilidad espermática a 8 h de conservación mostraron diferencias altamente significativas ($P=0.0001$) con un coeficiente de variación de 8.64 %, misma que indica que los datos son confiables. Para la evaluación de medias Duncan ($\alpha=0.05$) a 8 h de conservación (figura 4) para el efecto de 6 SEs, sobre el % de motilidad a 8 horas de conservación, el SE con TCG logró conservar un 61.0 % motilidad, siendo superior a los demás SEs, seguido por TACP, TCF, TAP y TG con 38.0, 30.0, 17.0 y 8.3 % de motilidad espermática, mientras que el SE TF, dejan de mantener motiles a los espermatozoides. Estos resultados se atribuyen que la incorporación del ácido cítrico es aceptable ya que forma parte en el metabolismo celular para la generación de ATP's.

El SE que mantiene motiles a los epz es el TCG, resultados que se atribuyen que los epz, utilizan como fuente de energía más frecuente a la glucosa, molécula que forma parte de la vía glucolítica generando 2 ADP, más 36 ATP's generados en el ciclo del ácido cítrico, completa un total de 38 ATP's suficiente para su mecanismo de movimiento espermático, a comparación de los demás SEs, que en su composición, quedándose solo con 36 ATP's y 6 moléculas de CO_2 .

Según el análisis de varianza (tabla 8) para el efecto de 6 SEs, sobre el % de motilidad espermática a 10 h de conservación mostraron diferencias altamente significativas ($P=0.0001$) con un coeficiente de variación de 10.5 %, misma que indica que aun los datos son confiables para el presente análisis.

La comparación de medias Duncan ($\alpha=0.05$) como se observa en la figura 5, la evaluación del efecto de los 6 SEs, sobre el % de motilidad a 10 h de conser-

vación, se observa que el SE con TCG logró conservar un 46.0 % de motilidad, siendo superior a los demás SEs, seguido por TACP, TAP, TCF y TG con 31.0, 12.0, 9.0 y 4.3 % de motilidad espermática respectivamente. Resultados que se atribuyen que, el medio no está afectando a las células, sino que el epz va liberando más CO_2 y agua, evento que al transcurrir el tiempo también pueda estar ocurriendo acidosis o alcalosis celular, ya que las células por efecto del pH pueden disminuir su metabolismo y por efecto la motilidad, llegando a una apoptosis celular a la reacción del CO_2 en los diferentes SEs.

En la figura 6, el comportamiento del efecto de 6 SEs sobre el % de motilidad espermática durante 10 horas, se aprecia que el SE TCG mantiene 61 % de motilidad hasta las 8 h de conservación, seguido por el SE TACP que manteniendo 55.0 % de motilidad hasta las 6 horas, datos que son mejores a los demás tratamientos, así mismo el TG manteniendo 57.7 % de motilidad hasta las 4 h, seguido por TAP que manteniendo 54.0 % de motilidad hasta las 4 h, mientras que los SE TCF y TF, mantiene mayor al 50.0 % de motilidad no mayor a 2 h, resultado que se atribuye a que los epz lograron metabolizar de acuerdo a la facilidad de aprovechamiento, mientras más fácil de asimilar, más generación de energía y más gasto de energía por la hiper-activación de las células y posterior muerte celular.

Los SEs TG y TAP, muestran datos similares a la hora 4 y 6, esta similitud puede deberse a que el epz no encuentran fuentes para generar ATP's, y las células espermáticas estas pasando por un problema de Apoptosis.

El dilutor TYG (tris-yema-glucosa) que mantiene mayor porcentaje de epz viables en llamas (motiles y vivos) conservados a 4 °C hasta 120 h para la inseminación artificial (Santalla 2013).

El dilutor Tris-glucosa mostró una vitalidad promedio de 54 ± 8 %, durante un tiempo de 5.8 h, dato que es inferior a los datos encontrados en la presente investigación con el SE TCG, y similar a los datos del SE TG con un a motilidad de 57.7 % de motilidad espermática a las 4 h (Raymundo *et al.* 2006).

Según el análisis de varianza (tabla 9) para el efecto de 6 SEs, sobre el % de vitalidad espermática a 0 h de conservación mostraron diferencias no significativas ($P=0.4008$) con un coeficiente de variación de 3.0 %, la misma que nos indica que los datos son confiables.

En la evaluación de medias Duncan ($\alpha=0.05$) a 0 horas de conservación (tabla 10), para la evaluación del efecto de los 6 SEs, sobre el % de vitalidad a 0 h de conservación, se observa que todos los SEs TCG, TG, TF, TCF, TCAP y TAP, logran conservar 97.0, 96.0, 95.0, 95.0, 95.0 y 94.0 % de vitalidad espermática.

Se puede atribuir que la ecuación química balanceada entre componentes químicos iniciales como el sustrato y los nuevos componentes químicos como producto formados para una reacción química particular, existe una reversibilidad del producto y sustrato (Dávalos & Olazábal 2002) y (Peter *et al.* 2008).

El análisis de varianza (tabla 11) para el efecto de 6 SEs, sobre el % de vitalidad espermática a 2 h de conservación mostraron diferencias altamente significativas ($P=0.0001$) con un coeficiente de variación de 5.5 %, la misma que nos indica que los datos son confiables.

La comparación de medias Duncan ($\alpha=0.05$), para la evaluación del efecto de los 6 SEs, sobre el % de vitalidad a 2 h de conservación (figura 7), se observa que el SE TCG logró conservar un 91.0 % de vitalidad, siendo superior a los demás SEs, seguido

por TCAP, TG, TCF y TAP, con 78.0, 76.0, 72.7 y 68.3 % de vitalidad, mientras que el SE TF solo logró mantener el 60.7 % de vitalidad espermática siendo dato inferior a los demás SEs.

La variabilidad de la motilidad entre los SEs evaluados a 2 h, los SEs TCG y TCAP, mantiene un proceso secuencial debido que, la glucosa y el ácido pirúvico deben pasar por un proceso de reestructuración de la molécula para ser incorporado en el ciclo del ácido cítrico, mientras que los SEs TAP y TF, tienen una reacción de difusión facilitada, penetrando en la célula; agua, urea, Na, K, fructosa, entre otros moléculas pequeñas, ocurriendo en la célula, un transporte activo primario, la energía procede directamente de la ruptura de la molécula de ATP o de otra molécula energética con fosfatos de alta energía (Peter *et al.* 2008).

Realizando el análisis de varianza (tabla 12) para el efecto de 6 SEs, sobre el % de vitalidad espermática a 4 h de conservación mostraron diferencias altamente significativas ($P=0.0001$) con un coeficiente de variación de 6.4 % que indica que los datos obtenidos son confiables.

En la figura 8 de comparación de medias Duncan ($\alpha=0.05$) a 4 h de conservación para la evaluación del efecto de los 6 SEs, sobre el % de vitalidad a 4 h de conservación, se observa que el SE TCG logró conservar un 89.7 % de vitalidad, siendo superior a los demás SEs, seguido por TCAP, TG, TAP, TCF y TF con 74.7, 65.3, 63.7, 55.7 y 36.7 % de vitalidad espermática.

Al pasar el tiempo los epz en los SEs TCF, TF y el testigo, por efecto de la temperatura los epz van acelerando su metabolismo celular y generando más ATPs y liberando en cada ciclo dos moléculas de CO_2 , esto hace que los epz al transcurrir el tiempo perdían la motilidad individual en caso de los SE y

en cambio el testigo, tiene nutrientes necesario para pasar el tracto peniano y almacenarse en un corto tiempo en la tracto genital de la hembra. A comparación de los SEs TCG, TCAP y TG, por ser moléculas complejas que antes de ingresar al ciclo deben pasar por un proceso de descarboxilación y oxidación para generar otras reacciones, hecho que permite que los epz realicen mejor su metabolismo (Blanco 2010).

Según el análisis de varianza (tabla 13) para el efecto de 6 SEs, sobre el % de vitalidad espermática a 6 h de conservación mostraron diferencias altamente significativas ($P=0.0001$), con un coeficiente de variación de 6.5 %, resultado que nos indica que los datos son confiables. En la evaluación de medias Duncan ($\alpha=0.05$), para la evaluación del efecto de los 6 SEs, sobre el % de vitalidad a 6 h de conservación, se observa que el SE TCG sigue logrando conservar un 80.7 % de vitalidad, siendo superior a los demás SEs, seguido por TCAP, TCF, TAP, TG y TAP, con 59.0, 42.3, 35.0 y 34.7 % de vitalidad, mientras que el TF, logran mantener solo el 7.7 % de vitalidad espermática, siendo datos inferiores a los demás SEs durante 6 h de conservación. (tabla 11)

El metabolismo glicolítico que desarrolla el espermatozoide, hace que el pH intracelular disminuya y el metabolismo celular quede reducido, el Tris en este caso puede regular el pH en un rango más amplio y no es dependientes de la temperatura, este componente tamponador está entre 6.8 a 7.2, esto no se estabiliza hasta las 8 - 9 min en el medio y en la célula ocurre por efecto del equilibrio del medio, la disponibilidad de los nutrientes es más fácil de asimilar, efecto por el cual la fructosa, son más fácil de incorporar a su metabolismo que a comparación de con la glucosa y el ácido pirúvico (Peter *et al.* 2008).

Según el análisis de varianza (tabla 14) para el efecto de 6 SEs, sobre el % de vitalidad espermática a 8 h de conservación mostraron diferencias altamente significativas ($P=0.0001$) con un coeficiente de variación de 6.7 %, dato que es confiable para el presente análisis.

En la valoración de medias Duncan ($\alpha=0.05$), para la evaluación del efecto de los 6 SEs, sobre el % de vitalidad a 8 h de conservación (figura 10), se observa que el SE con TCG logró conservar 66 % de vitalidad, siendo superior a los demás SEs, seguido por TACP, TCF, TAP y TG con 44.3, 35.0, 25.3 y 13 % de vitalidad, mientras que el SE TF, solo logran mantener un 1 % de vitalidad espermática, siendo inferiores a los demás SEs.

El SE que mantiene viables a los epz es el TCG, resultado que se atribuye el los epz utilizan como fuente de energía más frecuente a la glucosa, molécula que forma parte de la vía glucolítica generando 2 ADP, más 36 ATP's generados en el ciclo del ácido cítrico, completa un total de 38 ATP's suficiente para su mecanismo de movimiento espermático, a comparación de los demás SEs, que en su composición, resulta ser insuficiente quedándose solo con 36 ATP's más 6 moléculas de CO_2 (Blanco 2010).

El análisis de varianza (tabla 15) expresa que para el efecto de 6 SEs, sobre el % de vitalidad espermática a 10 h de conservación mostraron diferencias altamente significativas ($P=0.0001$) con un coeficiente de variación de 7.4 %, lo cual nos indica que los datos son confiables.

En cuanto a las medias Duncan ($\alpha=0.05$) a 10 h de conservación (figura 11) para la evaluación del efecto de los 6 SEs, sobre el % de vitalidad espermática a 10 h de conservación, se observa que el SE TCG logro conservar un 56.0 % de vitalidad, siendo superior a los demás SEs, seguido por TCAP, TCF,

TAP y TG con 38.0, 18.0, 13.0 y 7.0 % de vitalidad espermática. Este resultado se atribuye que el ácido cítrico participa directamente el metabolismo celular y su posterior reacción para la generación de ATP's (Peter *et al.* 2008).

El comportamiento del efecto de 6 SEs sobre el % de vitalidad espermática evaluados durante 10 h, el SE con TCG mantiene un 66.0 % de vitalidad espermática hasta 8 h de conservación como se observa en la figura 5, a comparación del SE TF, muestra un 60.07% de vitalidad en un tiempo de 2 h, esto se atribuye a la disponibilidad de azúcares en el medio, la velocidad de asimilación de los mismo y la liberación inmediata de desechos metabólicos como el CO₂ en el medio.

Limachi (2013), indica que el porcentaje de vitalidad debe estar superpuesto a 60 - 72 % de espermatozoides vivos y por encima del 50% de motilidad, para una eficiente inseminación artificial. Donde la vitalidad y la motilidad espermática van relacionadas uno con otro (figura 12).

El sustrato energético TCG llegó a mantener una mayor vitalidad de los espermatozoides los cuales estarían aptos para la IA hasta las 8 a 9 h ya que el mismo contiene azúcares que es utilizado para la generación de energía, resultando que el espermatozoide siga manteniéndose con vida gracias a su metabolismo celular y posterior generación de ATP a partir de la glucosa (Gonzales 2005).

Los factores que influyen en la reducción del % de vitalidad a partir de 3 a 4 h en los demás tratamientos, derivado por la mayor actividad presente en los espermatozoides por estar expuestos a 35 °C de temperatura. Además, parece ser que en el interior de los sustratos energéticos existe la formación de radicales libres en el transcurso del tiempo. Limachi (2013), menciona que para la oxidación, algún ele-

mento cede electrones libres, proceso denominado oxidación y otra, necesariamente los recibe, proceso denominado reducción, del cual forman nuevos radicales libres, que con el tiempo conducirían a la muerte de la célula espermática.

Las células espermáticas conservadas a 35 °C se mantienen móviles donde los espermatozoides siguen con su actividad metabólica produciendo ATP en la mitocondria gracias al ciclo de Krebs, a partir del ácido cítrico. Mediante la oxido-reducción se forma radicales libres que son responsables de los cambios estructurales y funcionales de los espermatozoides llevando a la muerte en el transcurso del tiempo (Peter *et al.* 2008).

Conflictos de intereses

Los autores agradecen al Laboratorio de Biotecnología de Reproducción Animal de la Carrera de Ingeniería Zootécnica (LBRA-INZ), Unidad Académica Campesina Tiahuanacu.

A los Comunarios del Municipio de Catacora por brindarnos los animales para realizar el presente estudio.

Agradecimientos

El presente trabajo ha cumplido con normas éticas en el manejo de los animales y no genera conflictos de interés.

Literatura citada

Aller F, Rebuffi G, Cancino A, Alberio R. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de

- llama (*Lama glama*). Arch Zootec 2003;52:15-23.
- Blanco F. Evaluación del efecto de cinco enzimas sobre las características macro-microscópicas del semen de llamas (*Lama glama* L.). [Tesis de Licenciatura]. Unidad Académica Campesina de Tiahuanacu. Universidad Católica Boliviana San Pablo. La Paz. Bolivia; 2010.
- Bravo F. Estudio Comparativo de Tres Métodos de Colección de Semen en Alpacas. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima; 2000. p. 96.
- Bravo PW, Pacheco C, Quispe G, Vilcapaza L, Ordoñez C. Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. Arch Androl 1999;43:239-46.
- Bravo PW, Stabenfeldt GH, Fowler ME, Lasley BL, Frey RE. Testes development and testosterone concentration in the llama (*Lama glama* L.). 12th ICAR, The Hague, The Netherlands; 1992.
- Dávalos R, Olazábal J. Evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas. Rev Inv Vet Perú 2002;13(2):98-9.
- Giuliano S, Chaves MG, Trasorras V, Gambarotta M, Neild D, Director A, et al. Development of an artificial insemination protocol in llamas using cooled semen. Anim Reprod Sci 2012;131(3-4):204-10.
- González V. Producción de Llamas. Universidad Católica Boliviana, Unidad Académica Campesina Tiahuanacu; 2010.
- Gonzales V. Efecto de la bulboureterectomía y periodicidad de colección en las características macro-microscópicas del eyaculado en llamas de tres edades. [Tesis de Licenciatura]. Unidad Académica Campesina de Tiahuanacu. Universidad Católica Boliviana San Pablo. La Paz. Bolivia; 2005.
- Huanca T, Mamani RH, Naveros ML, Pacheco JI, Condori N. Variación individual y estacional de las características seminales en la alpaca (*Vicugna pacos* L.) Spermova 2011;1(1):98-100.
- Huanca W, Cordero A, Huanca T, Adams G. Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos: Avances y perspectivas. Arch Latinoam Prod Anim 2007;15:195-201.
- Paricahua E. Evaluación del eyaculado sin la secreción de las glándulas anexas en alpaca. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional del Altiplano-Puno. Perú; 2001.
- Peter J, Robert K, David A, Kathleen M, Victor W, Anthony W. Enzimas mecanismo de acción, capítulo 7, 28° ed. Harper; 2008.
- Plan de Desarrollo Municipal. Municipio de Tiahuanacu. Provincia Ingavi; 2011.
- Raymundo F, Huanca W, Huanca T, Huerta S, Cordero A. Efecto de tres dilutores en la conservación del semen de alpacas. Rev Inv Vet Perú 2006;17(2):125-30.
- Santalla I. Viabilidad espermática del semen de llama (*Lama glama* L.) refrigerado en cuatro dilutores. [Tesis de Licenciatura]. Unidad Académica Campesina Tiahuanacu. Universidad Católica Boliviana San Pablo. La Paz- Bolivia; 2013.
- Sumar J, Leyva V. Colección de semen mediante la vagina artificial en alpaca. En: Resúmenes IV Conf. Internacional en Camélidos Sudamericanos. Punta Arenas, Chile; 1981.
- Vaughan J, Galloway D, Hopkins D. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos* L.). RIRDC Rural Industries Research and Devel-

opment Corporation; 2003. Pub. N°03/104,
Kingston.
