

Artículo original:

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN REFRIGERADO EN LLAMA **Artificial insemination with cooled semen in Llama**

S.M. Giuliano

Área de Física Biológica, Instituto de Investigaciones y Tecnología en Reproducción Animal (INTRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, Argentina

Email:

smgiulia@fvet.uba.ar

Palabras Clave:

Inseminación, semen, refrigerado, Llama

INTRODUCCIÓN

El mejoramiento genético de los camélidos sudamericanos (CSA) está limitado, entre otros, por los siguientes factores: un intervalo generacional largo, un período prolongado de gestación de 342 a 350 días y hembras monótocas que pueden tener un máximo de 4 crías en toda su vida reproductiva. La aplicación de biotecnologías reproductivas permitiría acortar los tiempos generacionales, favorecer la propagación genética de animales superiores con mayor rapidez y formar un banco genético mediante la criopreservación de gametas. Aunque la inseminación artificial (IA) con semen preservado ha tenido muy buenos resultados en las diferentes especies domésticas, permitiendo el mejoramiento genético (especialmente en el ganado bovino), no ha sido así en los CSA. Los porcentajes de preñez del 0 al 10 % obtenidos hasta el momento al inseminar con semen refrigerado o congelado de llama y alpaca (Bravo *et al.*, 2000; Aller *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2003), indicarían que los espermatozoides de estas especies sufren un deterioro en su capacidad fertilizante, porque a pesar de que se insemine igual cantidad de espermatozoides viables y móviles, con el semen criopreservado se obtiene un menor porcentaje de preñez que con semen fresco.

REFRIGERACIÓN DE SEMEN

Para desarrollar un protocolo que permita obtener preñez mediante inseminación artificial con semen de llama refrigerado durante 24 horas, primeramente, estudiamos la capacidad protectora de diferentes diluyentes sobre la movilidad e integridad funcional de espermatozoides refrigerados de llama. Para ello, refrigeramos 46 muestras de semen de llama, diluidos 1:1 en Lactosa (11%); yema de huevo (20%) (L-Y), durante 24 h y determinamos que con respecto a las variables del semen fresco, habían aumentado en forma significativa el porcentaje de espermatozoides móviles y con endósmosis y que se había mantenido el porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra (Giuliano *et al.*, 2005). También observamos que en el semen refrigerado, había una asociación positiva entre la variable movilidad espermática y las variables espermatozoides con membrana íntegra y espermatozoides con endósmosis y que se conservaba asociación positiva entre estas dos últimas variables. Posteriormente, en un mismo eyaculado, comparamos la capacidad protectora de 4 diluyentes: L-Y; Tris – ácido cítrico – fructosa – yema de huevo (T-F-Y); Suero sanguíneo de llama (descomplementado) (40%) – PBS (60%) (S-PBS) y Leche descremada- glucosa (diluyente Kenney®) (L-G). Al estudiar la influencia de los diluyentes en la movilidad espermática a 5° C luego de 24 h de refrigeración se determinó que no había

diferencias significativas entre el porcentaje de movilidad del semen fresco y el semen refrigerado con L-Y; y que los porcentajes de movilidad en el semen fresco y en refrigerado en L-Y eran significativamente superiores a los obtenidos al refrigerar con los diluyentes T-F-Y; S-PBS y L-G.

Es destacable que la muestra de semen refrigerada con L-Y fue la única que conservó la movilidad espermática del semen refrigerado y que presentó un porcentaje de movilidad significativamente superior a los obtenidos al refrigerar con el resto de los diluyentes. Al comparar nuestros resultados con los citados por otros autores, podemos observar que son superiores a los obtenidos en semen de llama por Huanca y Gaulty (2001). Estos autores diluyeron el semen 1:1 en BSA - glucosa y lo refrigeraron a 5° C. A partir de un 54% de movilidad espermática inicial comprobaron los siguientes porcentajes: a las 6 h, 43% de movilidad; a las 12 h, 28%; a las 24 h, 21%; a las 48 h; 14% y a las 72 h, 8,7%. Es interesante destacar que a las 12 h de refrigeración ya habían obtenido una disminución del 50 % en el porcentaje de movilidad. Si tenemos en cuenta los efectos de la refrigeración en espermatozoides de epidídimo de llama o en eyaculados de alpaca, podemos observar que, con respecto a la movilidad espermática, también se han superado los resultados obtenidos al diluir y refrigerar espermatozoides de epidídimo de llama (Ratto *et al.*, 1999) y de epidídimo de alpaca (Santiani *et al.*, 2005;

Morton *et al.*, 2007) y a los obtenidos en eyaculados de alpaca (Vaughan *et al.*, 2003) Es interesante resaltar que a pesar de que Morton *et al.*, (2007) utilizaron diluyente L-Y, no obtuvieron los mismos resultados que en nuestro trabajo, ya que partiendo de un porcentaje de movilidad espermática de 46,9 y 4,5 % observaron una movilidad de 31,9 y 3,8 % pos refrigeración. Esta diferencia podría atribuirse a diferencias en el material biológico y a diferencias en el procesamiento de la muestra previo a la refrigeración.

Los demás autores utilizaron los diluyentes Tris - yema; Kenney® y Colorado® (Ratto *et al.*, 1999); citrato de sodio - glucosa - yema de huevo (Morton *et al.*, 2007); diluyentes comerciales con yema de huevo (Sheep Red Extender®, Camel Green Extender Triladryl® y Biladyl® A y B) o diluyentes comerciales sin productos de origen animal (Andromed®, Biociphos®, Plus® y Bioxccl®) (Vaughan *et al.*, 2003). Con respecto a las curvas de enfriamiento utilizadas, Morton *et al.*, 2007; Vaughan *et al.*, 2003 y Santiani *et al.*, 2005 reportaron curvas con rangos entre 1,5 a 2 h coincidiendo con lo realizado en nuestro trabajo. Morton *et al.*, (2007), luego de diluir y refrigerar a 4° C espermatozoides de epidídimo de alpaca también determinaron que el porcentaje de movilidad espermática obtenido al diluir 1:1 y refrigerar con lactosa 11% (80%) - yema de huevo (20%) fue superior los obtenidos a diluir 1:1 o 1: 2 y refrigerar con un diluyente con Tris – ácido cítrico – glucosa y yema de huevo (20%). Con respecto a los espermatozoides con integridad de membrana (vivos), es interesante resaltar que solamente las muestras refrigeradas con el diluyente L-Y no presentaron diferencias significativas con respecto a los espermatozoides vivos del semen fresco. También es notable que a pesar de que el diluyente L-G conservó el porcentaje de espermatozoides con endósomosis, no ocurrió lo mismo con el porcentaje de movilidad espermática; y que solo el diluyente L-Y conservó la movilidad espermática y la integridad funcional de la membrana plasmática. El diluyente S-PBS fue el que peor preservó la movilidad e integridad funcional de los espermatozoides refrigerados de llama.



Figura 1: Extracción de semen de llama utilizando una hembra como súcubo

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN REFRIGERADO

Para estudiar y determinar una dosis inseminante con semen refrigerado y un intervalo óptimo entre inducción de ovulación e inseminación, se realizó lo siguiente: las hembras fueron distribuidas al azar en 4 grupos (A, B, C, D). El monitoreo de la dinámica folicular se realizó diariamente mediante palpación y ultrasonografía transrectal. Ante la presencia de un folículo dominante en fase de crecimiento, se indujo la ovulación mediante la administración de 8 µg de buserelina (Receptal®, Laboratorio Hoescht) por vía endovenosa. Todas las IA se realizaron con eyaculados diluidos 1:1 con LY porque fue el que mejor conservó los parámetros espermáticos. Grupo A (n=8): las hembras fueron inseminadas con una dosis fija de 12×10^6 espermatozoides vivos mantenidos a 37° C, Grupo B (n=8): las hembras fueron inseminadas con una dosis fija de 12×10^6 espermatozoides vivos refrigerados a 5° C durante 24hs. Grupo C (n=10): las hembras fueron inseminadas con el eyaculado completo (dosis variable) refrigerado a 5° C durante 24hs. Estos grupos: A, B, y C fueron inseminados a tiempo fijo (22 a 24hs pos inducción de la ovulación). Grupo D (n=13): las hembras fueron inseminadas con el eyaculado completo (dosis variable) refrigerado a 5° C durante 24hs y la inseminación fue realizada entre las dos horas de ocurrida la ovulación. Los porcentajes de preñez fueron los siguientes: 75%, 0%, 0% y 23% para los grupos A, B, C y D respectivamente. En nuestro laboratorio se comunicaron las primeras preñeces obtenidas mediante inseminación artificial con semen refrigerado en llamas (Giuliano *et al.*, 2012). La vía de inseminación que utilizamos fue la vía transcervical.



Figura 2: Extracción de semen en llama por electroeyaculación

El semen diluido y refrigerado se depositó en el cuerno uterino (cerca de la unión uterotubárica) ipsilateral al ovario con el folículo dominante. La vía transcervical fue utilizada por la mayoría de los autores en llama y alpaca (Fernández Vaca y Novoa, 1968; Aller *et al.*, 1977, 2003; Bravo *et al.*, 1977, 1999, 2000; Vaugahn *et al.*, 2003), como así también en camellos y dromedarios (Skidmore y Billah, 2006) ya que reproduce lo más fisiológicamente posible el lugar de depósito del semen en la eyaculación (durante la monta el pene penetra los anillos del cérvix y deposita el eyaculado en el

extremo de los cuernos uterinos, cerca de la unión útero-tubárica).

Es interesante destaca que cuando se inseminó con una dosis fija (12 x 10⁶ vivos) y a las 24hs de inducción de la ovulación, no se obtuvieron preñeces con semen refrigerado y si con semen mantenido a 37° C (O y 75% respectivamente). Por lo tanto aunque se insemine con igual dosis de espermatozoides vivos no se logra el mismo resultado con semen refrigerado que con semen mantenido a 37° C. Cuando se inseminó con el eyaculado completo, el rango de la dosis inseminante fue muy amplio (12-210 millones espermatozoides con membrana íntegra). La dosis inseminante con la que se obtuvo preñez (a partir de los 76 millones de espermatozoides con membrana íntegra totales) es superior a las dosis con las que obtuvieron preñez con semen fresco: 28,9 ± 18,7 x 10⁶ espermatozoides totales (Aller *et al.*, 1997); 4 a 12 x 10⁶ espermatozoides totales (Bravo *et al.*, 1999). Por otra parte fue similar a las dosis utilizadas con semen refrigerado: 125 - 170 x 10⁶ con las que no se obtuvo preñez (Vaughan *et al.*, 2003). Con respecto al intervalo entre la inducción de la ovulación y la inseminación artificial, según la bibliografía, cuando se inseminó con semen fresco o diluido a 37° C inmediatamente o luego de 24 h de haber inducido la ovulación, se obtuvieron porcentajes de preñez mayores al 40% (Aller *et al.*, 1997; Bravo *et al.*, 1997) y de fertilización del 52 % (Calderón *et al.*, 1968). Cuando inseminamos con este mismo intervalo IO – IA de 24 h con semen refrigerado no obtuvimos preñez (grupos B y C), como así tampoco obtuvo Vaughan *et al.*, (2003) en alpacas. Si consideramos que la ovulación se produce a las 28,6 ± 0,36 horas pos-administración exógena de LH o de análogos de GnRH., podemos deducir que, al momento de ser inseminadas a las 24 h, la mayoría de las hembras no habían ovulado aún. Esta inferencia fue confirmada en este presente trabajo ya que la mayoría de las hembras del grupo D ovularon luego de 27 horas de realizada la inducción. Es de destacar que cuando inseminamos después de haber confirmado la ovulación mediante ultrasonografía se obtuvo un mejor resultado el cual se reflejó en un porcentaje de preñez del 23% (3/13) (grupo D). Resultados similares reportaron Gonzales *et al.* (2011) quienes, obtuvieron un mayor porcentaje de fertilidad inseminando con semen refrigerado de alpaca, 28 horas post inducción de la ovulación.



Figura 3: Inseminación transcervical en el cuerno ipsilateral al ovario con folículo dominante

CONCLUSIONES

El diluyente Lactosa 11% (80%) – yema de huevo (20 %) es el que preservaría mejor el semen de CSA durante el proceso de refrigeración por que tendría un efecto estabilizador de la membrana espermática al preservar la movilidad y la funcionalidad e integridad del espermatozoide refrigerado de CSA. Si consideramos que para obtener preñez con semen refrigerado se necesitó inseminar luego de confirmar la ovulación, e inseminar con una dosis inseminante mayor a la utilizada con semen a 37° C; estos hechos ratificarían que en los CSA ocurre lo observado en otras especies, en las cuales se necesitan más espermatozoides para obtener un grado aceptable de fertilización con semen preservado (Watson, 2000); y también podrían estar indicando que la refrigeración provocaría en los espermatozoides un proceso de capacitación o un proceso similar a la capacitación. Este proceso de capacitación o similar a la capacitación, podría ser producido por la refrigeración, y ya ha sido observado con anterioridad en otras especies (Watson, 1995; Neild *et al.*, 2003; Silva y Gadella, 2006). Por esto sería conveniente realizar la inseminación una vez detectada la ovulación y así acortar el tiempo de encuentro de las dos gametas, evitando que la mayoría de los espermatozoides mueran por haber completado su reacción acrosomal.

BIBLIOGRAFIA

- Aller, J.; L. Ferre; G.E. Rebuff; R.H. Alberio. 1997. *Veterinaria Argentina* XIV (136): 394-400.
- Aller, J.; A.K. Cancino; G.E. Rebuffi; R.H. Alberio. 1999. *Actas II Congreso Mundial sobre Camélidos*, Cusco, Perú, 72.
- Aller, J.F., Rebuffi, G.E., Cancino, A.K., Alberio, R.H., 2003. *Arch. Zootec.* 52, 15-23.
- Bravo, P.W.; C. Ordonez; V. Alarcon. 1996. Abstract, *13th. Int. Congr. Anim. Reprod., Sydney* (2): 2–3.
- Bravo, P.W.; U. Flores; J. Garnica; C. Ordoñez. 1997. *Theriogenology*, 47: 619-626.
- Bravo, P.W.; C. Pacheco; G. Quispe; L. Vilcapaza; C. Ordoñez. 1999. *Archives of Andrology* (43): 239-246.
- Bravo, P.W.; J.A. Skidmore; X.X. Zhao. 2000. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 173–193.
- Fernández Baca, S.; C. Novoa. 1968. *Rev. Fac. Med. Vet. Lima* 22: 9.
- Giuliano, S.; A. Director; V. Trasorras; D. Maizon; M. Miragaya. *Biocell*, 30(1)
- Giuliano S.M.; Chaves M.G.; Trasorras V.L.; Gambarotta, M., Neild, D.; Director A.;
- González, C.; T. Huanca; M.O. Cárdenas. 2011. *SPERMOVA* 1(1): 102-103
- Pinto, M.; M.H. Miragaya. 2012. *Animal Reproduction Science*, 131: 204-210.
- Huanca, W.; M. Gaulty. 2001. *Rev. Inv. Vet. Peru* 1:460-461.
- Morton, K.M.; A.B. Roslyn Bathgate; G. Evans; W.M. Maxwell. 2007. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(7): 792–796
- Neild, D.M.; M. Bart; M. Gadella; G. Chaves; M. Miragaya; B. Colenbrander; A. Agüero. 2003. *Theriogenology*, 59: 1693-1705.

16. Ratto, M.H.; M. Wolter; C. Gomez; M. Berland. 1999. *II Congreso Mundial sobre Camélidos* – Cusco, Peru: 79-80.
17. Santiani, A.; W. Huanca; R. Sapana; T. Huanca; N. Sepúlveda; N. Sánchez. 2005. *Asian Journal of Andrology*; 7 (3): 303–309.
18. Silva, P.F.N.; B.M. Gadella. 2006. *Theriogenology*, 65: 958-978.
19. Skidmore, J.A.; M. Millah. 2006. *Theriogenology* (66): 292-296.
20. Vaughan, J.; D. Galloway; D. Hopkins. 2003. RIRDC Rural Industries Research and Development Corporation, Pub. N° 03/104, Kingston, Australia, 74-77.