

Artículo original:

USO DE LA DIMETILFORMAMIDA EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EN LLAMA (*Lama glama*)

Use of dimethylformamide semen cryopreservation of llama (*Lama glama*)

M.I. Carretero, (1,3); R. Santa Cruz, (1,3); D. Neild, (1,3); C. Arraztoa, (1,3); F. Fumuso, (1,3); S. Giuliano, (2,3)

(1) Cátedras de Teriogenología y

(2) Cátedra de Física Biológica,

(3) INTRA

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

E-mail:

smgiulia@fvet.uba.ar

Palabras Clave:

Llama, semen, criopreservación, DMF

INTRODUCCIÓN

El aumento del comercio de las fibras naturales de alta calidad, así como de pieles y carnes con bajo contenido de colesterol de los CSA hacen necesario el uso de estrategias reproductivas tendientes a mejorar la producción de los rodeos y el acervo genético de futuros reproductores. Dentro de las limitaciones que enfrentan la producción y el mejoramiento genético de los CSA se incluye la falta de aplicación de tecnologías de producción mejoradas, que resulta en pérdidas elevadas por mortalidad y morbilidad, baja eficiencia reproductiva, pobre crecimiento corporal y baja producción de fibra. Las características particulares del semen de los CSA (viscosidad estructural y filancia elevada, nula movilidad progresiva espermática, bajo número de espermatozoides totales) han condicionado el desarrollo de los protocolos de inseminación artificial (IA) con semen criopreservado (Giuliano *et al.*, 2008; 2010; 2012; Casareto *et al.*, 2012). Consecuentemente esta tecnología está limitada al uso de semen fresco con una tasa de preñez máxima de 77% en centros experimentales, y de no más de 50% en criaderos particulares (Tibary y Vaughan, 2006; Huanca *et al.*, 2007; Maxwell *et al.*, 2008). El semen de los CSA presenta viscosidad estructural elevada (Casareto *et al.*, 2012) y cuando los eyaculados se pipetea, tienen filancia formando un hilo de extensión variable (Giuliano *et al.*, 2010a). Estas características reológicas han dificultado mucho la separación de los espermatozoides del plasma seminal, el fraccionamiento de los eyaculados en alícuotas, la dilución y el envasado de las pajuelas (Tibary y Vaughan, 2006; Huanca *et al.*, 2007; Giuliano *et al.*, 2010). Además la baja concentración espermática y el bajo volumen limitan el número de dosis obtenido por eyaculado. La incubación del semen con una solución de colagenasa en Hepes-TALP-BSA, evita la formación de hilo, pudiendo separar los espermatozoides del plasma seminal e induciendo movilidad espermática progresiva manteniendo la viabilidad (Giuliano *et al.*, 2010). También la evaluación se ve dificultada debido a que los espermatozoides no presentan movilidad progresiva, sólo movilidad oscilatoria (Vaughan *et al.*, 2003; Giuliano *et al.*, 2005, 2010;) haciendo necesaria la implementación de pruebas de evaluación de la calidad del eyaculado que permitieron identificar espermatozoides potencialmente fértiles aunque estuviesen inmóviles (Giuliano *et al.*, 2005)

CRIOPRESERVACION DE SEMEN

Son pocos los reportes sobre inseminación artificial con semen congelado. Bravo *et al.* (2000) obtuvieron, en alpacas, un 26% de preñez utilizando un diluyente a base de citrato de sodio - yema de huevo y un 7% de glicerol. Aller *et al.* (2003) obtuvieron un 7% de preñez, en llamas, utilizando un diluyente que contenía citrato de sodio - yema de huevo - glucosa, glicerol y DMSO. A su vez, Vaughan *et al.*, (2003) obtuvieron resultados negativos luego de inseminar alpacas con semen congelado utilizando el diluyente Green/clear camel buffer® y Biladyl® A y B. Es notorio que al inseminar con semen criopreservado, con el mismo número de espermatozoides móviles y con sus membranas íntegras y funcionales que en semen fresco, no se obtenga porcentajes de

preñez similares (Aller *et al.*, 2003, Vaughan *et al.*, 2003; Giuliano *et al.*, 2012).

Consecuentemente no se ha podido realizar en los CSA, a nivel mundial, campañas de IA a gran escala con semen criopreservado como sucede en otras especies de interés reproductivo o deportivo. Los protocolos de congelamiento de semen varían según las especies. En los procesos de congelado y descongelado el espermatozoide puede dañarse a causa de los rápidos cambios de las condiciones fisicoquímicas que se producen durante el enfriamiento y la formación de hielo. La intensidad de estos cambios depende mucho de la composición de los diluyentes y de la curva de enfriamiento utilizada. Tanto en humanos como en animales domésticos y silvestres se estudió y se trató de determinar

la combinación óptima de curva de enfriamiento y diluyente. Desde que Phillips en 1939 descubrió que la yema de huevo tenía un efecto beneficioso sobre la fertilidad del semen y Polge *et al.*, en 1949 vieron la acción crioprotectora del glicerol, ambos han sido extensamente utilizados en la composición de los diluyentes. La yema de huevo protege al espermatozoide del shock por frío; su efecto protector estaría dado por su habilidad para interactuar con la bicapa lipídica de la membrana espermática (Watson, 1975; Foulkes, 1977, Watson, 1995), impidiendo eventos de transición de fase en los lípidos de las membranas (Drobnis *et al.*, 1993).

El glicerol es un crioprotector penetrante y su efecto protector es atribuible a sus propiedades coligativas (Salomon y Maxwell, 1995). Es marcada la variación de la tolerancia al glicerol entre especies, que va desde un 3% en el cerdo hasta un 10 – 20 % en marsupiales (Holt, 2000). Además la concentración óptima de glicerol utilizada en los diluyentes está limitada por su toxicidad que a su vez depende de la especie, de la tasa de enfriamiento y congelamiento, de la composición del diluyente y del método de adición al mismo. Debido a los efectos tóxicos del glicerol es que se ha buscado reemplazarlo por otros crioprotectores, como las amidas (Alvarenga *et al.*, 2005). Las amidas son crioprotectores penetrantes de menor peso molecular comparado con el glicerol, característica que les permite penetrar la membrana plasmática espermática más rápido disminuyendo su toxicidad (Squires *et al.*, 2004). Otros protectores de membrana son los azúcares que actúan no sólo por sus propiedades coligativas sino también interactuando directamente con la membrana. En esta acción estarían implicados puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los azúcares y los grupos fosfatos de los fosfolípidos. Los azúcares también podrían disminuir la temperatura de transición de fase de los fosfolípidos. Generalmente los disacáridos son más efectivos que los monosacáridos en estabilizar la bicapa lipídica de la membrana (De Leeuw *et al.*, 1993).

Con respecto a los protocolos de criopreservación en los CSA, el glicerol ha sido prácticamente el único crioprotector empleado (Bravo *et al.*, 2000; Aller *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2003; Santiani *et al.*, 2005) y en menor medida se ha probado etilenglicol en alpacas (Santiani *et al.*, 2005; 2013). Como en los CSA no se conoce cuales serían la temperatura de estabilización y concentración de crioprotector que mejor conserven la capacidad fertilizante de espermatozoides congelados, en nuestro laboratorio realizamos un estudio en el cual el objetivo fue determinar una combinación óptima entre diferentes temperaturas de equilibramiento y/o crioprotectores que conserve la viabilidad espermática e integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides de llama sometidos a congelamiento profundo.

Se procesaron 14 eyaculados obtenidos mediante electroeyaculación de 7 machos de llama (n=7, r=2). Se evaluaron las siguientes características seminales: movilidad espermática (con microscopio de contraste de fases), y funcionalidad e integridad de membrana plasmática (mediante el HOS test y tinción con los fluorocromos CFDA/PI de acuerdo a Giuliano *et al.*, 2008). Las muestras se diluyeron 8:1 en una solución de colagenasa al 0,1% en H-TALP-BSA y se incubaron a 37° C durante 8 minutos para disminuir la filancia del plasma seminal (Giuliano *et al.*, 2010). Luego se dividieron en 4 alícuotas. A dos de ellas se les agregó diluyente a base de lactosa y yema de huevo (LY) con

glicerol (LY-G) o con N,N-dimetilformamida (LY-DMF) y se estabilizaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las alícuotas restantes se diluyeron con LY, se las enfrió hasta alcanzar los 5° C, se les adicionó LY-G o LY-DMF y se estabilizaron a esa temperatura por 20 minutos. Luego de cada período de estabilización, se envasaron las muestras en pajuelas y se realizó el congelamiento profundo en un termo de nitrógeno líquido (Miragaya *et al.*, 2001) donde fueron conservadas hasta su evaluación. Todas las muestras presentaron una concentración espermática final de 40×10^6 espermatozoides/ml y una concentración final de glicerol o de N,N-dimetilformamida del 7%. El descongelamiento se realizó a 75° C durante 7 seg. y luego a 37° C por 15 seg. Mediante un test de Student apareado se comparó el semen fresco con todos los tratamientos de congelamiento.

Se utilizó un diseño factorial (2x2) tomando al macho como bloque para comparar entre sí los tratamientos. Al comparar las variables espermáticas entre el semen fresco y el congelado-descongelado se observó lo siguiente: el semen congelado con el diluyente LY-DMF presentó un porcentaje de movilidad significativamente mayor ($p \leq 0,05$) y el congelado con el diluyente LY-G presentó un porcentaje de movilidad significativamente menor ($p \leq 0,05$) que el semen fresco. El semen congelado con todos los tratamientos presentó un porcentaje de espermatozoides vivos significativamente menor ($p \leq 0,05$) que el semen fresco. El semen congelado con todos los tratamientos presentó un porcentaje de espermatozoides con membrana funcional significativamente menor ($p \leq 0,05$) a excepción de la muestra equilibrada a 5° C con LY-G que no tuvo diferencias significativas con el semen fresco. Al comparar las variables espermáticas entre los diferentes tratamientos se observó lo siguiente: no se encontró interacción significativa entre las diferentes temperaturas de equilibramiento y los diferentes crioprotectores. El semen congelado con el diluyente LY-DMF presentó un porcentaje de movilidad espermática significativamente mayor ($p \leq 0,05$) que el obtenido al congelar con LY-G. El semen congelado luego de equilibrar a 5° C presentó un porcentaje de espermatozoides vivos significativamente mayor ($p \leq 0,05$) que el obtenido luego de equilibrar a temperatura ambiente.

En un estudio posterior nuestro objetivo fue determinar si era posible utilizar concentraciones de DMF menores a 7% conservando la viabilidad espermática e integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides de llama sometidos a congelamiento profundo. Se utilizaron nueve eyaculados provenientes de seis machos. Las muestras fueron incubadas con una solución de colagenasa al 0,1%. Posteriormente, se dividió cada muestra en 4 alícuotas: a 2 de ellas se les agregó, a temperatura ambiente, diluyente a base de lactosa y yema de huevo (LY) con 2% o 4% de DMF, estabilizándose durante 20 minutos a esa temperatura, (TA2% y TA4% respectivamente). Las alícuotas restantes se diluyeron con LY, se las enfrió hasta alcanzar los 5° C, se les adicionó LY con 2% o 4% de DMF y se estabilizaron a 5° C durante 20 minutos (5°-2% y 5°-4% respectivamente). Finalizada la estabilización de las alícuotas se realizó el congelamiento profundo de las mismas. Se evaluó la movilidad espermática y funcionalidad e integridad de la membrana plasmática en semen fresco y luego del descongelamiento de cada grupo. Se utilizó un diseño factorial de 5 niveles para comparar entre sí los distintos tratamientos y con respecto al semen fresco.

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de movilidad progresiva entre el fresco y los diferentes tratamientos ($p > 0,05$). El porcentaje de endósmosis y de espermatozoides vivos fue significativamente menor en todos los tratamientos respecto al fresco ($p \leq 0,05$). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos entre sí en ninguna de las variables analizadas ($p > 0,05$). En conclusión, según estos resultados, ninguna de las combinaciones entre las diferentes temperaturas de equilibrio (temperatura ambiente y 5° C), con ambas concentraciones de DMF (2% y 4%).

En conclusión: según estos resultados preliminares el equilibrio a 5° C y el agregado de N,N-dimetilformamida sería el protocolo que mejor conservaría la movilidad, viabilidad e integridad funcional de los espermatozoides de llama. Y por otra parte ninguna de las combinaciones entre las diferentes temperaturas de equilibrio (temperatura ambiente y 5° C), con ambas concentraciones de DMF (2% y 4%) fueron eficientes para preservar la funcionalidad y viabilidad de la membrana plasmática de espermatozoides de llama sometidos a congelamiento profundo.

REFERENCIAS.

- Aller J.F., Rebuffi G.E., Cancino A.K., Alberio R.H., 2003. *Arch.Zootec.* 52, 15-23.
- Alvarenga M.A., Papa F.O., Landim-Alvarenga F.C., Medeiros A.S.L., 2005. *Animal Reproduction Science*, 89(1-4):105-113.
- Bravo P.W., Skidmore J.A., Zhao X.X., 2000. *Animal Reproduction Science*, 62: 173-93.
- Casaretto C., Martinez Sarrasague M., Giuliano S., Rubin de Celis E., Gambarotta M., Carretero I., Miragaya M., 2012. *Andrologia, Alemania. Supplement*, 44:335-341
- Conde P., Herrera C., Chaves M., Giuliano S., Director A., Trasorras V., Pinto M., Sarchi M., Stivale D., Rutter B., Agüero A., Miragaya M., Pasqualini R., 2008. *Animal Reproduction Science*, 109 (1-4):298-308
- De Leeuw F. E., De Leeuw A. M., Den Daas J. H. G., Colenbrander B., Verkleij A. J., 1993. *Cryobiology* (30): 32-44.
- Drobnis E.Z., Crowe L.M., Berger T., Anchoroguy T.J., Overstreet J.W., Crowe J.H., 1993. *J. Exp. Zool.* 265: 432-437.
- Foulkes J.A., 1977. *J Reprod Fertil*; 49 (2): 277-84. Garnica J., Achata, R., Bravo P.W., 1993. *Animal Reproduction Science*, 32, 85-90.
- Garnica J., Achata, R., Bravo P.W., 1993. *Animal Reproduction Science*, 32, 85-90.
- Giuliano S.; Director A, Trasorras V.; Maizon D., Miragaya M., 2005. *Biocell*, 30(1) ISSN 0327-9545
- Giuliano S., Director A., Gambarotta M., Trasorras V., Miragaya M., 2008. *Animal Reproduction Science*, 104, 359-369.
- Giuliano S., Carretero M., Gambarotta M., Neild D., Trasorras V., Pinto M., Miragaya M., 2010. *Animal Reproduction Science*, 118 (1): 98-102.
- Giuliano S.M.; Chaves M.G.; Trasorras V.L.; Gambarotta, M., Neild, D.; Director A.; Pinto M., Miragaya M.H. 2012, *Animal Reproduction Science* 131; 204-210.
- Holt W.V., 2000. *Theriogenology*; 53 (1): 47-58. Review.
- Huanca W., Cordero A., Huanca T., Adams G., 2007. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.*, 15 (1): 195-201.
- Lichtenwalner A.B., Woods G.L., Weber J.A., 1996. *Theriogenology* 46, 293-305.
- Maxwel, C., Evans, G., Morton, K. M., 2008. Extender abstracts WBC / ICAR Satellite Meeting on Camelid Reproduction, 19-25. Available online in www.ivis.org/proceedings/camelrepro/2008/toc.asp
- Miragaya M.H, Chaves M., Neild D., Berretta C., Agüero A., 2001. Proceedings of 3rd International Symposium on Stallion Reproduction. Fort Collins, Colorado, USA. pp 45.
- Phillips P.H., 1939. *J.Biol. Chem* 130, 145.
- Polge C., Smith A., Parkes A., 1949. *Nature*. 1949 Oct 15;164(4172):666.
- Salomon S. and Maxwell W.M.C., 2000. *An. Reprod. Sci* 62, 77-111
- Santiani, A., Huanca, W., Sapaná R., Huanca, T., Sepúlveda, N., Sánchez, N., 2005. *Asian Journal of Andrology* 7 (3), 303-309.
- Santiani Acosta A., Evangelista Vargas S., Valdivia Cuya M., Risopatrón González J., Sánchez Gutiérrez R., 2013. *Theriogenology*, 79: 842-846.
- Squires E. L., Keith S. L., Graham J. K., 2004. *Animal Reproduction Science* (99): 342-353..
- Tibary, A., Vaughan, J., 2006. *Small Ruminant Research* (61): 283-298
- Vaughan, J., Galloway, D., Hopkins, D., 2003. *RIRDC Rural Industries Research and Development Corporation*, Pub. N° 03/104, Kingston, Australia.
- Watson P.F., 1975. *J Reprod Fertil*, 42 (1): 105-11.
- Watson, P.F., 1995. *Reprod. Fertil. Dev.* (7): 871