

**EFFECTO DEL CRIOPROTECTOR DIMETILFORMAMIDA SOBRE LA MOVILIDAD DE
ESPERMATOZOIDES DE ALPACA (*Vicugna pacos*) CRIOPRESERVADOS
EVALUADOS MEDIANTE EL SISTEMA DE ANALISIS ISAS®**

Dimethylformamide cryoprotectant effect on cryopreserved alpaca sperm motility
(*Vicugna pacos*) evaluated by analysis system ISAS®

N.H. Flores¹, H. Cucho¹, M.I. Carretero^{3,4,5}, R. Ciprián¹, H. Quispe¹, N. Calderón¹,
M. Miragaya^{3,5}, S. Giuliano^{2,3}

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.10>

¹ Carrera Profesional de
Zootecnia, Universidad
Nacional de San Antonio
Abad del Cusco,

² Cátedra de Física Biológica,

³ Cátedra de Teriogenología,

⁴ INITRA,

⁵ CONICET,

Facultad de Ciencias
Veterinarias, UBA,
Argentina.

E-mail:
dbionils@gmail.com

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar el efecto de la Dimetilformamida (DMF) sobre los patrones de movilidad y de velocidad en espermatozoides de alpaca criopreservados, utilizando el Integrated Semen Analysis System (ISAS®). Se procesaron 25 eyaculados de 5 alpacas. Cada eyaculado se incubó 4 minutos a 37 °C con una solución de colagenasa. Posteriormente, las muestras se diluyeron 1:1 en TRIS, fructosa y yema de huevo. Se las enfrió hasta alcanzar los 5 °C, se dividieron en dos alícuotas y se les adicionó 4% o 7% de Dimetilformamida (DMF). Se equilibraron a 5 °C (1 hora) y se realizó el congelamiento. Las muestras se descongelaron a 37 °C durante 1 minuto. Se capturaron imágenes para evaluar los diferentes patrones de movilidad: estáticos, móviles no progresivos (MNP) y móviles progresivos (MP) y los patrones de velocidad y los índices. Se evaluaron las siguientes muestras: semen fresco, semen tratado con colagenasa, semen equilibrado a 5 °C y semen descongelado (4 o 7% DMF). Se utilizó un diseño factorial tomando al macho como bloque para comparar el semen fresco con el semen congelado/descongelado, el semen fresco (con y sin colagenasa) con el semen equilibrado y el semen equilibrado con el semen descongelado. No se observaron diferencias significativas en los espermatozoides MNP y MP entre el semen fresco y el descongelado. La velocidad media fue significativamente mayor en las muestras equilibradas y descongeladas con 4 o 7% de DMF respecto del semen fresco. Estos resultados podrían indicar que la dilución del semen previo al proceso de criopreservación podría modificar el patrón de velocidad de los espermatozoides de alpaca.

Palabras clave: Alpaca, movilidad espermática, ISAS®, criopreservación.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of Dimethylformamide (DMF) on motility patterns and velocity of cryopreserved alpaca sperm, using the Integrated Semen Analysis System (ISAS®). We processed 25 ejaculates of 5 male alpacas. Each ejaculate was incubated four minutes at 37 ° C. The samples were cooled at 5° C and divided in two aliquots. After that 4% or 7% of DMF were added, the aliquots were equilibrated for 1 hour and freezing was performed. Samples were thawed at 37 ° C for 1 minute. The following samples were evaluated: fresh semen, semen treated with collagenase, equilibrated semen at 5 ° C and freeze-thawed semen (4 or 7% DMF). Images were captured to evaluate the different patterns of motility: static, motile non progressive (MNP) and motile progressive (MP) and speed patterns and indexes. An analysis of variance (factorial design) was used to compare fresh semen with frozen/thawed semen, fresh semen (with and without collagenase) with equilibrated semen and equilibrated semen with frozen/thawed semen, using the male as a blocking factor. No significant differences were observed in MP and MNP between fresh and thawed sperm. The average speed was significantly higher in samples t frozen/hawed and equilibrated with 4 or 7% DMF compared to fresh semen. These results could indicate that dilution prior to cryopreservation semen may change the speed pattern of sperm alpaca..

Keywords: *Alpaca, sperm motility, ISAS, cryopreservation.*

INTRODUCCIÓN.

En la actualidad, 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 y es 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 que los resultados obtenidos luego de la IA utilizando semen criopreservado han sido bastante desalentadores (Bravo *et al.*, 2000; Vaughan *et al.*, 2003; Aller *et al.*, 2003; Huanca *et al.*, 2007; Giuliano *et al.* 2012). Esto motiva la aplicación de diferentes técnicas que permitan evaluar los efectos que sufren los espermatozoides criopreservados. Existen estudios en los que se han evaluado la movilidad, la funcionalidad e integridad de membrana, la integridad acrosomal y el ADN en

espermatozoides de alpaca (Santiani Acosta *et al.*, 2013) y de llama (Carretero *et al.*, 2014) sometidos a un proceso de criopreservación. Sin embargo, no hay reportes, donde se utilice un sistema computarizado de análisis de semen (ISAS®) para estudiar la movilidad de espermatozoides de alpaca obtenidos por electroeyaculación y criopreservados. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del crioprotector Dimetilformamida al 4 y 7% sobre la movilidad y los valores promedios de velocidad utilizando el ISAS® en espermatozoides de alpaca sometidos a un proceso de criopreservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue realizado en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS) La Raya de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco a 4130 msnm. Se obtuvieron un total de 25 eyaculados provenientes de 5 alpacas (n= 5, r= 5), colectados por electroeyaculación (ElectroJac5, Ideal Istruments) mediante anestesia general. Cada eyaculado se incubó durante 4 minutos a 37 ° C en una solución de colagenasa al 0,1%. Posteriormente, las muestras se diluyeron 1:1 en un diluyente a base TRIS, fructosa y yema de huevo (25%) y se las enfrió hasta alcanzar los 5 ° C. Luego, se dividieron en dos alícuotas y se les adicionó 4 o 7% de DMF. Se equilibraron a 5 ° C durante 1 hora y se realizó el congelamiento en pajuelas de 0,25 ml. El descongelamiento se realizó en un baño a 37 ° C durante 1 minuto.

Se utilizó el sistema ISAS® para evaluar la movilidad de las siguientes muestras: 1- semen fresco, 2- semen tratado con colagenasa, 3- semen equilibrado con 4 o 7% de DMF y 4- semen descongelado con 4 o 7% de DMF. Las muestras se evaluaron sobre la platina temperada a 37 ° C en un microscopio UOP-UB200i, con una lente de 10X de contraste de fase negativo (equipo CASA). Se evaluaron 10 microvideos, cada señal de video fue adquirida con una video cámara Proiser 782C, que consta de la captura de 25 imágenes por segundo. Se determinó el porcentaje de espermatozoides estáticos, móviles progresivos (MP) y móviles no progresivos (MNP). Además se determinaron los diferentes patrones de velocidad: velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad media (VAP) y de índice: índice de rectitud (STR), índice de linealidad (LIN) e índice de oscilación (WOB).

Análisis estadístico: se utilizó un diseño factorial tomando al macho como bloque para comparar el semen fresco con el semen congelado/descongelado, el semen fresco (con y sin colagenasa) con el semen equilibrado y el semen equilibrado con el semen descongelado. Las variables que no dieron normalidad y homogeneidad de varianzas fueron transformadas a

raíz cuadrada o logaritmo natural. Se utilizó el programa el Statistix 8.0.

RESULTADOS

Los porcentajes de espermatozoides estáticos, móviles no progresivos (MNP) y móviles progresivos (MP) pueden observarse en la tabla 1. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de MNP y MP entre el semen fresco y el semen descongelado (con

4 o 7% de DMF) ($P < 0,05$). Tampoco se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides MNP y MP entre el semen descongelado con 4% de DMF y el descongelado con 7% de DMF ($P > 0,05$). El porcentaje de espermatozoides móviles no progresivos (MNP) fue significativamente mayor en el semen equilibrado (con 4 o 7% DMF) respecto del semen descongelado (con 4 o 7% DMF) ($P < 0,05$).

Tabla 1. Porcentaje de espermatozoides estáticos, móviles progresivos (MP) y móviles no progresivos (MNP) en muestras de semen fresco, semen tratado con collagenasa, semen equilibrado y semen descongelado con 4 y 7% de dimetilformamida. Los valores son promedio \pm DS ($n = 5$, $r = 5$).

Subpoblación (%)	Semen fresco	Semen con collagenasa	Equilibrado		Congelado/descongelado	
			DMF 4%	DMF 7%	DMF 4%	DMF 7%
Estáticos	88,9 \pm 4,6 ^{abc}	80,8 \pm 8,3 ^{abc}	65,3 \pm 9,4 ^{bc}	62,0 \pm 11,9 ^c	89,6 \pm 2,2 ^{ab}	92,11 \pm 3,4 ^a
MNP	10,1 \pm 4,3 ^{ab}	17,9 \pm 8,0 ^{abc}	31,8 \pm 8,3 ^c	36,3 \pm 11,7 ^c	9,7 \pm 1,8 ^a	7,5 \pm 3,2 ^a
MP	1,0 \pm 0,82 ^{ab}	1,1 \pm 0,8 ^{ab}	2,9 \pm 2,5 ^a	1,7 \pm 1,2 ^{ab}	0,7 \pm 0,76 ^b	0,5 \pm 0,57 ^b

^{a, b, c} Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los valores de los parámetros de velocidad (VCL, VSL y VAP) y los parámetros de índice (LIN, STR y WOB) se pueden observar en la tabla 2. La velocidad media (VAP) fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en las muestras equilibradas y descongeladas con 4 y 7% de DMF respecto del semen fresco. También, la VAP fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en el semen equilibrado (con 4 y 7% DMF) respecto del descongelado (con 4 y 7% DMF). La velocidad curvilínea (VCL) fue significativamente mayor en el semen equilibrado con 4% DMF respecto del equilibrado con 7% DMF. No se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en los parámetros de velocidad (VCL, VSL, VAP) ni en los parámetros de índice (LIN, STR y WOB) entre el semen descongelado con 4% de DMF y el descongelado con 7% de DMF ($P > 0,05$).

DISCUSIÓN

La evaluación de los diferentes patrones y parámetros de la movilidad de los espermatozoides a través del sistema ISAS® ha sido utilizado en numerosas especies. Sin embargo, las características de los eyaculados de CSA, entre ellas la ausencia de movilidad progresiva, han limitado el uso de esta tecnología en la evaluación de los eyaculados. En CSA, existe un estudio en el que evalúan la movilidad de espermatozoides de llama en semen fresco mediante el ISAS® (Fumuso *et al.* 2014). Este es el

primer trabajo en el que se evalúa objetivamente la movilidad en espermatozoides de alpaca criopreservados, obtenidos mediante electroeyaculación.

Los valores de movilidad total en el semen descongelado (8,0 - 10,4%) fueron menores al observado en semen de alpaca criopreservado con 7% de etilenglicol y antioxidantes (19,7 - 22,1%) y al observado por Carretero *et al.*, (2014) en espermatozoides de llama criopreservados con 7% de DFM (22,1 - 22,5%). Sin embargo, fueron similares a lo observado en espermatozoides de alpaca criopreservados con etilenglicol sin el agregado de antioxidantes (11,4%; Santiani Acosta *et al.*, 2013). Los diferentes porcentajes de movilidad observados entre éste y los estudios mencionados podrían deberse a las diferentes especies estudiadas (alpaca vs. llama), a las diferentes metodologías utilizadas para la evaluación (objetiva vs. subjetiva), a los diferentes diluyentes utilizados (Tris-fructosa-yema de huevo vs. Leche descremada-fructosa-yema de huevo y Lactosa-yema de huevo) y a los diferentes crioprotectores utilizados (DMF vs. etilenglicol).

Un resultado interesante fue el aumento de la velocidad media que se observó en los espermatozoides diluidos con el extender (tanto en los espermatozoides equilibrados como en los descongelados) respecto del semen fresco. Este resultado debería tenerse en cuenta

en los protocolos de criopreservación debido a que este aumento precoz de la velocidad media en los espermatozoides sometidos a un proceso de

criopreservación podría estar interfiriendo en la capacidad fertilizante de esos espermatozoides.

Tabla 2. Porcentajes de los patrones de velocidad y de índice de la movilidad de espermatozoides de alpaca: velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad media (VAP), índice de rectitud (STR), índice de linealidad (LIN) e índice de oscilación (WOB) en muestras de semen fresco, semen tratado con colagenasa, semen equilibrado y semen descongelado con 4 y 7% de dimetilformamida. Los valores son promedio \pm DS (n= 5, r= 5).

Parámetro	Semen fresco	Semen con colagenasa	Equilibrado		Congelado/descongelado	
			DMF 4%	DMF 7%	DMF 4%	DMF 7%
VCL ($\mu\text{m/s}$)	34,0 \pm 10,2 ^b	34,9 \pm 11,6 ^b	50,3 \pm 11,0 ^a	38,7 \pm 9,5 ^b	36,7 \pm 12,4 ^b	34,0 \pm 10,7 ^b
VSL ($\mu\text{m/s}$)	7,3 \pm 1, ^a	7,4 \pm 1,9 ^a	12,6 \pm 3,0 ^b	9,8 \pm 1,8 ^{ab}	9,5 \pm 3,9 ^{ab}	8,5 \pm 2,8 ^{ab}
VAP ($\mu\text{m/s}$)	16,2 \pm 3,2 ^a	17,0 \pm 4,8 ^{ab}	25,8 \pm 3,0 ^c	22,7 \pm 3,3 ^d	18,9 \pm 5,3 ^b	19,2 \pm 5,1 ^b
LIN (%)	22,6 \pm 4,9 ^a	22,8 \pm 6,4 ^a	25,5 \pm 4,8 ^a	25,2 \pm 6,5 ^a	26,0 \pm 5,17 ^a	25,7 \pm 5,2 ^a
STR (%)	45,4 \pm 5,9 ^a	45,5 \pm 7,8 ^a	48,6 \pm 8,6 ^a	43,4 \pm 5,7 ^b	49,7 \pm 10,9 ^a	44,8 \pm 9,2 ^{ab}
WOB (%)	49,9 \pm 7,5 ^a	49,7 \pm 7,5 ^a	53,1 \pm 9,5 ^{ab}	60,3 \pm 7,5 ^c	52,9 \pm 7,0 ^{ab}	57,7 \pm 7,7 ^{bc}

^{a, b, c} Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas (P<0,05).

CONCLUSIÓN

Fue posible evaluar el efecto de la dimetilformamida (al 4 y 7%) en la movilidad y en los valores promedios de velocidad en espermatozoides de alpaca criopreservados, utilizando el sistema ISAS®. El aumento de la velocidad media en los espermatozoides de alpaca procesados para un protocolo de congelamiento profundo podrían estar indicando que la dilución de las muestras previo a la criopreservación podría estar cambiando el patrón de movilidad de los espermatozoides y así interferir en su capacidad fertilizante.

Agradecimientos.

PRONABEC (Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo) e investigadores del CICAS: Virgilio Alarcón, Cesar Ordoñez y Enrique Ampuero.

REFERENCIAS

- Aller JF, Rebuffi GE, Cancino AK, Alberio RH. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). Arch. Zootec. 2003; 52: 15-23.
- Bravo PW, Skidmore JA, Zhao XX. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. Anim. Reprod. Sci. 2000; 62: 173-193.
- Carretero MI, Neild D, Ferrante A, Caldevilla M, Arraztoa C, Fumuso F, Giuliano S. Effect of

cryoprotectant and equilibration temperature on *Lama glama* sperm cryopreservation. Andrologia. 2014. doi: 10.1111/and.12319.

- Fumuso FG, Carretero MI, Neild DM, González L, Miragaya M, Giuliano SM. Use of the Integrated Semen Analysis System (ISAS®) for the evaluation of llama sperm motility. Invet 2014; 12 (2): 156.
- Giuliano S, Chaves MG, Trasorras V, Gambarotta M, Neild D, Director A, Pinto MH, Miragaya M. Development of an artificial insemination protocol in llamas using cooled semen. Anim. Reprod. Sci. 2012; 131 (3-4): 204-210.
- 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.
- Santiani Acosta A, Evangelista Vargas S, Valdivia Cuya M, Risopatrón González J, Sánchez Gutierrez R. Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. Theriogenology 2013; 79: 842-846.
- Vaughan J, Galloway D, Hopkins D. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). RIRDC Rural Industries Research and Development Corporation 2003; Pub. N°03/104, Kingston, Australia.