

Artículo original:

EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DE SEMEN DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANO

Semen collection and evaluation of South American Camelids

Giuliano, S.M.

INTRODUCCIÓN

Catedra 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:

Semen, camélido, evaluación, espermatozoide

Es de conocimiento que la postura adoptada por los camélidos sudamericanos (CSA) durante la cópula, la duración de la misma (10 – 50 minutos) y el patrón de eyaculación, han ocasionado en estas especies un retraso en el estudio de las características del semen y en la implementación de biotecnologías reproductivas tales como la inseminación artificial (IA) y la producción de embriones in vitro. En la actualidad, se utilizan diferentes métodos de extracción de semen y/o de obtención de espermatozoides de CSA. Es indiscutible que cada uno de estos métodos presenta características particulares y que todos presentan ventajas y desventajas que hay que tener en cuenta en la toma de decisiones. Además, el semen de los CSA presenta características particulares tales como extrema filancia y viscosidad (Casetto *et al.*, 2011), bajo porcentaje de movilidad progresiva y bajo número de espermatozoides totales (Giuliano *et al.*, 2010). Estas particularidades seminales condicionan aún más la elección del método de recolección. También hay que tener en cuenta otras consideraciones al optar por una u otra metodología, tales como la especie de CSA (doméstica o silvestre) y el uso de la muestra (evaluación, IA, producción de embriones, investigación, etc.).

EXTRACCIÓN DE SEMEN DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Para extraer semen de CSA silvestres es necesario contar con una metodología que no precise la cooperación del animal, que permita extraer semen de calidad en forma repetible y que no afecte la posterior utilización del macho como reproductor ya que son especies protegidas. Hasta la actualidad el único método con el que se ha podido extraer semen de CSA silvestres es mediante electroeyaculación (EE). Giuliano *et al.* (2002); Pacheco *et al.*, (2010) han extraído semen de vicuña y Giuliano *et al.*, (2009) de guanaco. En las especies domésticas (llama y alpaca) también se ha obtenido semen mediante EE (Director *et al.*, 2004; Giuliano *et al.*, 2008; Vencato *et al.*, 2008; Giuliano *et al.*, 2010). Se deberá tener en cuenta además que si se extrae semen para la evaluación de reproductores a campo, donde la extracción se puede realizar en el mismo momento del examen, es necesario, según el método empleado, que el macho esté entrenado y/o que tenga libido adecuada. En nuestro laboratorio, al comparar eyaculados obtenidos con EE versus vagina artificial (VA), obtuvimos eyaculados con mayor volumen, movilidad espermática e integridad espermática y con menor porcentaje de cabezas sueltas al utilizar EE que con VA (Giuliano *et al.*, 2008). Dado que con EE obtuvimos preñeces con semen refrigerado (Giuliano *et al.*, 2012) y embriones por fertilización in vitro (FIV) (Trasorras *et al.*, 2011) y por la técnica de inyección intracitoplasmática (ICSI) (Conde *et al.*, 2008) se puede inferir que mediante la EE se pueden obtener eyaculados potencialmente fértiles sin necesidad de la cooperación del macho

Por otra parte, se pueden obtener eyaculados sin espuma y limpios de calidad igual o superior a los obtenidos mediante VA (Giuliano *et al.*, 2008). Su mayor desventaja es que se necesitan profesionales y equipo especializado para realizar anestesia general y el protocolo correcto de preparación y estimulación eléctrica. Sumar y Leyva (1981) implementaron por primera vez en los CSA el uso de la vagina artificial (VA) fundándose en el hecho de que los machos de camélidos montan a toda hembra que adopte la posición de decúbito esternal. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para extraer semen de llama y alpaca por diversos autores utilizando como súcubo un maniquí o una hembra (ejemplos: Lichtenwalner *et al.*, 1996; Ferré *et al.*, 1996; von Baer y Hellemann, 1998; Bravo *et al.*, 2000; Aller *et al.*, 2003; Morton *et al.*, 2008). La extracción de semen con VA presenta la ventaja de no necesitar un equipo de costo elevado y que puede ser llevado a cabo por técnicos especializados. Por otra parte, mediante VA se han obtenido preñeces con semen fresco y criopreservado (Bravo *et al.*, 2000; Aller *et al.*, 2003) y embriones mediante ICSI (Miragaya *et al.*, 2003). Una de las principales desventajas que presenta es que se necesita contar con cierta cantidad de días dedicados al entrenamiento de los machos, reportándose porcentajes de rechazo del 10 al 40% por indocilidad o falta de libido (Lichtenwalner *et al.*, 1996; Ferrer *et al.*, 1996; von Baer y Hellemann, 1998; Aller *et al.*, 2003; Giuliano *et al.*, 2008). Esta circunstancia puede hacer imposible la extracción de semen de machos seleccionados. Y por otro lado los eyaculados extraídos mediante VA suelen contener impurezas del suelo y ser muy espumosos (von Baer y Hellemann, 1998; Aller *et al.*, 2003; Giuliano *et al.*, 2008).



Con respecto a la obtención de semen mediante esponjas o fundas intravaginales o aspiración poscoital, sólo una pequeña proporción del eyaculado es recuperada y generalmente se encuentra mezclada con secreciones vaginales, contaminación con glóbulos rojos (debido a las lesiones en el tracto reproductivo de la hembra o del pene) (Director *et al.*, 2007) que como es sabido, son desfavorables para la supervivencia de los espermatozoides. Estas metodologías presentan, además, la desventaja de que el eyaculado puede ser incompleto o no representativo, ya que la muestra se toma de la vagina o de una funda y la eyaculación de los CSA es intrauterina. Mediante aspiración poscoital se han obtenido embriones por la técnica de ICSI (Sansinera *et al.*, 2007) y se han evaluado la morfología espermática (Tibary, datos no publicados) y se han realizado estudios de morfometría y movilidad espermática (Ordóñez *et al.*, datos no publicados). Utilizando espermatozoides lavados de epididimo se han realizado estudios de morfología espermática (Contreras *et al.*, 2009), criopreservación (Santiani *et al.* 2008, Morton *et al.*, 2007) y se han producido embriones in vitro (ejemplos: Gamarra *et al.*, 2008; Huanca *et al.*, 2009; Condori *et al.*, 2010; Berland *et al.*, 2011). También se han realizado estudios con espermatozoides obtenidos de los conductos deferentes (Pacheco *et al.*, 2009). Las ventajas de usar espermatozoides de epididimo o de los conductos deferentes consisten en que estas células presentan movilidad progresiva y el manejo en el laboratorio es sencillo por la ausencia de la filancia y viscosidad característica del plasma seminal. La mayor desventaja es que estos protocolos se utilizan en espermatozoides provenientes de animales de matadero (en el caso de los espermatozoides epididimarios) o que con el tiempo inutilizan reproductivamente al macho (canalización de los conductos deferentes).



Extracción de semen de llama utilizando una hembra como súcubo



Extracción de semen en Llama por electroeyaculación



IZQUIERDA. eyaculado obtenido mediante VA.



DERECHA. eyaculado obtenido mediante EE

EVALUACIÓN DE SEMEN DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Con respecto a la evaluación del semen de los CSA, en nuestro laboratorio, al estudiar el factor individuo, determinamos que cada macho presentó características diferentes para cada variable y que ciertas características presentaban variabilidad inherente o propia de la especie (Giuliano *et al.*, 2008). Estas observaciones permiten explicar la amplitud de los rangos de las variables seminales reportados por los diferentes autores. Además, cuando estudiamos el efecto de los métodos de recolección de semen y el efecto de la época del año se reconoció que ciertas variables presentaban diferentes valores, según el método de recolección utilizado y según la época del año. Estas observaciones sugieren que, para obtener óptimos resultados en planes de IA o de fertilización asistida, puede ser importante la combinación entre el método de recolección y la época del año. Es de conocimiento que la evaluación de las características del semen es necesaria para implementar planes de manejo reproductivo y que los métodos tradicionales de estimación de la calidad de los eyaculados de diferentes especies se han basado principalmente en la evaluación de la movilidad individual, la morfología espermática y el número total de espermatozoides. Debido a que estas características han tenido una capacidad limitada para predecir la fertilidad de los eyaculados se han desarrollado métodos para la evaluación de la integridad funcional de la membrana espermática. Debido a que los espermatozoides de CSA no presentan movilidad progresiva fue necesario determinar si en el eyaculado de llama existe una población de espermatozoides inmóviles con las membranas funcionales e íntegras. Con este objetivo, en nuestro laboratorio, se pusieron a punto estas técnicas y al realizar pruebas de asociación entre movilidad espermática, funcionalidad e integridad de membrana se determinó que en el semen de llama hay una importante población de espermatozoides inmóviles con las membranas funcionales e intactas (Giuliano *et al.*, 2005; Giuliano *et al.*, 2008). Por lo tanto, se ha podido establecer que el porcentaje de movilidad espermática no sería un estimador de la calidad del eyaculado y que la presencia de espermatozoides inmóviles o con poca movilidad sería una condición inherente o propia de estas especies. El test de endósmosis ha sido reportado también en espermatozoides de alpaca (Vázquez *et al.*, 2012).



La viscosidad del plasma seminal de los CSA ha sido rutinariamente evaluada utilizando técnicas subjetivas tales como la medición del hilo formado al pipetear la muestra de semen (Bravo *et al.*, 1999; Bravo *et al.*, 2000). La formación de hilo no refleja a viscosidad del semen, sino que se está evaluando la filancia del mismo. La filancia se define como la capacidad de formación de hilo y es por lo tanto, una característica reológica diferente a la viscosidad. En nuestro laboratorio al evaluar la viscosidad estructural y aparente de 45 eyaculados de llama, mediante un viscosímetro de cono plato, determinamos que no había relación entre la formación de hilo y las viscosidades medidas ya que muchas muestras presentaron valores altos de viscosidad aparente y estructural y no formaron hilo (Casaretto *et al.*, 2011a). Además, cuando se compararon estas características reológicas (viscosidad estructural y aparente) entre muestras tratadas o no con una solución de colagenasa, no se encontraron diferencias significativas a pesar de que las muestras tratadas enzimáticamente no formaron hilo a ser pipeteadas y las muestras no tratadas sí lo formaron (Casaretto *et al.*, 2011a).

Estos resultados también confirmaron que no se debe evaluar la viscosidad mediante la formación de hilo ya que la viscosidad no varió en las muestras tratadas enzimáticamente y si varió la formación de hilo y por lo tanto varió la filancia. Con respecto a la evaluación de la morfología espermática de los CSA, observamos que hay diferencias estadísticamente significativas entre machos en el porcentaje de espermatozoides normales y que esta variabilidad también se vio reflejada en el rango de los coeficientes de variación de cada macho (Giuliano *et al.*, 2008). Asimismo observamos que, debido al gran polimorfismo que presentan los espermatozoides de estas especies no ha sido posible detectar un solo patrón morfológico al realizar mediciones morfométricas objetivas a 8000 cabezas de espermatozoides de llama mediante un analizador digital de imágenes (Casaretto *et al.*, 2011b).

Es de conocimiento que la evaluación de la morfología nuclear, del estado de condensación y o daño de la cromatina ha cobrado cada vez mayor importancia en el examen de un eyaculado ya que la cromatina espermática puede presentar diferentes alteraciones como consecuencia de una gran variedad de factores. Con el fin de evaluar a la cromatina espermática, en nuestro laboratorio, se pusieron a punto diversas técnicas para evaluar la morfología nuclear (Giuliano *et al.*, 2011), la condensación de la cromatina (Carretero *et al.*, 2009) y el daño del ADN (Carretero *et al.*, 2012). Estas técnicas han permitido evaluar el posible efecto sobre la cromatina, del proceso de refrigeración y de la incubación de muestras de semen con soluciones de colagenasa.



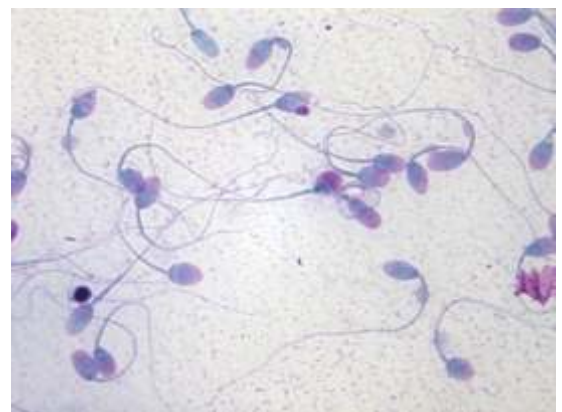
Microscopio de contraste de fase con Platina térmica, para evaluación de semen

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta las características, ventajas y desventajas de los métodos de extracción de semen, los métodos de electroeyaculación y de vagina artificial serían los adecuados para implementar protocolos de evaluación, de investigación, de inseminación artificial y de producción de embriones in vitro. Los métodos de extracción basados en las fundas vaginales y aspiración post-coital, serían útiles sólo como métodos para evaluar una muestra de semen y no para el procesamiento del semen a gran escala sin descontar que es posible que haya preñez no programada. La obtención de espermatozoides mediante lavado de epididimos o de conductos deferentes no podría ser utilizada para el procesamiento rutinario del semen de animales con genética superior. Sin embargo, las características de las muestras obtenidas mediante estos métodos permiten realizar protocolos de investigación sobre criopreservación y producción de embriones in vitro. Con respecto a la evolución de semen de CSA habría que tener en cuenta que la presencia de espermatozoides inmóviles o con poca movilidad sería una condición inherente o propia de la especie y que por lo tanto el porcentaje de movilidad en el semen fresco no sería un parámetro indicativo de la calidad del eyaculado. Además hay que tener en cuenta que ciertas características seminales de los eyaculados presentan gran variabilidad inherente o propia de la especie.



Formación de hilo al pipetear semen de CSA



Espermatozoides de llama teñidos



BIBLIOGRAFIA

- Aller J.F., Rebuffi G.E., Cancino A.K., Alberio R.H., Arch. Zootec. 2003, 52, 15-23.
- Berland, M.A., von Baer, A., Ruiz, J., Parraguez, V., Morales, P., Adams, G.P., Ratto, M.H., 2011. *Theriogenology* 75, 1482-1488.
- Bravo P.W., Callo P. Garnica J. 2000. *Small Ruminant Research* 38, 91-95.
- Carretero, M.I.; Giuliano, S.M; Casaretto, C.; Gambarotta, M.; Neild, D.M, 2009. *In Vet* 11(1): 55-63.
- Carretero, M.I.; S.M. Giuliano; C.I. Casaretto; M.C. Gambarotta; D.M. Neild. 2012. *Andrología*. 44, 239-247.
- Carretero, M.I.; D. Lombardo; C.C. Arraztoa; S.M. Giuliano; M.C. Gambarotta; D.M. Neild. 2012. *In Animal Reproduction Science*. 131(1-2):63-71
- Casaretto, C.; M. Martinez-Sarrasague; S. Giuliano; E. Rubin de Celis; M. Gambarotta; I. Carretero; M. Miragaya. 2011a. *Andrología*, Alemania. 2012 Supplement, Vol. 44, p335-341.
- Casaretto, C.; D. Lombardo; S. Giuliano; M.I. Carretero; M. Miragaya. 2011b. *Andrología*, Alemania. Supplement, Vol. 44, 424-430.
- Conde, P.; C. Herrera; M. Chaves; S. Giuliano; A. Director; V., Trasorras; M. Pinto; M. Sarchi; D. Stivale; B. Rutter; A. Agüero; M. Miragaya; R. Pasqualini. 2011. *Anim. Reprod. Sci* 109: 298-308.
- Condori, R.L.; W. Huanca; M. Chileno; J. Cainzo; F. Valverde; J.J. Becerra; L.A. Quintela; P.G. Herradon. 2010. *Reproduction, Fertility and Development*, 23: 224
- Contreras, W.S.; B. Odoñez-Mulato; B.R. Condor; J.R. Sonco Quispe J.R.. 2008. *XXXII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal* APPA. CDROOM.
- Director, A.; S. Giuliano; M. Carretero; M. Pinto; V. Trasorras; M. Miragaya. 2007. *Journal of Camel Practice and Research*. 14. N 2: 203-206.
- Ferré, L.B.; A. Werkmeister. 1996. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 16 (4), 363-365.
- Gamarra, G.; E. Huaman; S. León; M. Carpio; E. Alvarado; M. Asparrin; W. Vivanco. 2008. *Reproduction, Fertility and Development*, 21:177-178.
- Giuliano, S.M.; S.E. Spirito; M.H. Miragaya; E.F. Capdevielle; A. Agüero; M.D. Boquet; M.R. Ferrari. 2002. *Theriogenology* 57:1.
- Giuliano, S.; A. Director; V. Trasorras; D. Maizon; M. Miragaya. 2005. *Biocell*, 30(1)
- Giuliano, S.; A. Director; M. Gambarotta; V. Trasorras; M. Miragaya. 2008. *Ani Reprod Scien*, 104:359-369.
- Giuliano, S.; I. Carretero; M. Pinto; V. Trasorras; J. Egey; J. von Thungen; A. Agüero; M. Miragaya. 2009. *Resúmenes en Actas V Congreso Mundial de Camelidos*, septiembre 2009. Riobamba, Ecuador
- Giuliano, S.; M. Carretero; M. Gambarotta; D. Neild; V. Trasorras; M. Pinto; M. Miragaya. 2010. *Anim. Reprod. Sci*, 118 (1): 98-102.
- Giuliano, S.M.; M.G. Chaves; V.L. Trasorras; M. Gambarotta; D. Neild; A. Director; M. Pinto; M.H. Miragaya. 2012. *Ani Reprod Sci* 131: 204-210.
- Giuliano, S.M.; M.R. Ferrari; M. I. Carretero. 2011 *Spermova*, 1: 62-63.
- Lichtenwalner, A.B.; G.L. Woods; J.A. Weber. 1996. *Theriogenology*, 46: 293-305.
- Miragaya, M.; C. Herrera; C. Quintans; M. Chaves; E. Capdevielle; S. Giuliano; M. Pinto; J. Egey; B. Rutter; S. Pasqualini; A. Agüero. 2003. *Memorias III Congreso Mundial sobre Camelidos* Bolivia, Tomo 1: 267-270.
- Morton, K.M.; P.C. Thomson; K. Bailey; G. Evans; W.M.C. Maxwell. 2010 *Reproduction in Domestic Animals* 45 (4): 637-643
- Pacheco et al., 2009 XXXII *Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal*, CDROOM
- Pacheco, J.I.; R.H. Mamani; H.W. Deza. 2011. *Spermova* (1), 131-132.
- Sansinena, M.J.; S.A. Taylor; P.J. Taylor; E.E. Schmidt; R.S. Denniston; R.A. Godke. 2007. *Anim. Reprod. Sci*, 99: 342-353.
- Santiani, A.; J. Banda; V. Fernández; M. Valdivia; S. Evangelista; L. Ruiz; R. Sandoval. 2008. *XXXI Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal* APPA. CDROOM.
- Sumar, J.; V. Leyva. 1981. In: *Proceedings of the IVth International Conference on South American Camelids*, Punta Arenas, Chile, 12.
- Trasorras, V.; S. Giuliano; G. Chaves; D. Neild; A. Agüero; N. Carretero; C. Baca Castex; A. Alonso; M. Pinto; J. Morell; M. Miragaya. 2011. *Reprod Domest Anim.* doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01917.x
- Vásquez, J.; E. Florentini; M. Valdivia. 2012. *Reprod Domest Anim.* Feb 15. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.01988.x.
- Vencato, J.; D. Ponce; E. Huamán; G. Gamarra; W. Vivanco. 2008. *Resúmenes Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal* APPA.
- von Baer, L.; C. Hellemann. 1998. Variables seminales en llama (Lama glama). *Arch. Med. Vet.* 30 (2)

