

METODOS DE RECUPERACION DE ESPERMATOZOIDES EN CAMELIDOS

S. M. Giuliano y C. R. Santa Cruz

Áreas de Física Biológica y Teriogenología, Instituto de Investigaciones y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, Argentina

E-mail: smgiulia@fvvet.uba.ar

La creciente demanda de fibra superfina y de carne con bajo porcentaje de colesterol de los camélidos sudamericanos (CSA) ha promovido la obtención de animales genéticamente superiores. La implementación de biotecnologías reproductivas es indispensable para acelerar el progreso genético en estas especies ya que presentan un intervalo generacional prolongado, gestaciones de 350 días y hembras monotocas. Por lo tanto es necesario estudiar las características del semen y su manejo para poder implementar planes de reproducción asistida tales como producción de embriones *in vitro* (FIV) e inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI) y así se podrían acortar los tiempos generacionales. El semen de los CSA presenta características particulares tales como alta filancia y viscosidad estructural que obstaculizan la evaluación y fraccionamiento del semen en alícuotas y la separación de los espermatozoides del plasma seminal (Giuliano *et al.*, 2010). Por otra parte los espermatozoides de estas especies no presentan movilidad progresiva en los eyaculados. Consecuentemente si se espera utilizar esta técnica con semen de macho de alto valor genético, a los cuales no se desea o no hay motivos para castrar, resulta necesario implementar metodologías que permitan utilizar eyaculados frescos o criopreservados. Para mejorar las características seminales en estas especies en nuestro laboratorio se implementó, un protocolo, mediante el cual es posible disminuir la filancia del eyaculado, inducir la movilidad progresiva y a su vez obtener embriones mediante las técnicas de FIV e ICSI (Conde *et al.*, 2008; Giuliano *et al.*, 2010).

Otra situación a tener en cuenta es que aún no se ha obtenido preñez utilizando embriones producidos *in vitro*. En nuestro laboratorio se están realizando estudios tendientes a mejorar los protocolos de obtención de embriones a través de estos métodos. Dentro de estos protocolos están incluidas las técnicas de preparación del semen, ya que requieren la recuperación de un alto porcentaje de espermatozoides móviles con morfología normal, libres de desechos celulares y de espermatozoides muertos. Los dos métodos principales de selección espermática son el swim up y el gradiente de densidad-centrifugación (Henkel y Schill, 2003). El método de swim up es el más comúnmente usado en medicina humana. Consiste en la selección de espermatozoides basado en su capacidad para nadar. Con esta técnica se puede obtener un alto porcentaje de espermatozoides móviles morfológicamente normales. Presenta la desventaja que necesita eyaculados con alta concentración espermática y movilidad. El método de gradiente de densidad-centrifugación se basa en que sólo los espermatozoides con alta movilidad pueden penetrar los diferentes gradientes de densidad y llegar al fondo del tubo. Su principal ventaja es que se puede utilizar en eyaculados de baja concentración espermática. Su desventaja radica en el costo y dificultad en la preparación de gradientes. En nuestro laboratorio se obtuvieron embriones mediante la técnica de FIV e ICSI utilizando una columna de Percoll® al 45% (Conde *et al.*, 2008). Por otra parte Mendoza *et al.* (2009), evaluaron dos métodos de recuperación (swim up y gradiente de Percoll®) de espermatozoides de epidídimo de alpaca. Estos autores no observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de blastocistos obtenidos por FIV entre ambos métodos de selección. La mayoría de los autores que trabajan con CSA han utilizado la centrifugación discontinua gradiente de Percoll® (Del Campo *et al.*, 1994; Miragaya *et al.*, 2003; Gamarra *et al.*, 2008; Conde *et al.*, 2008; Huanca *et al.*, 2009; Huanca *et al.*, 2010; Condori *et al.*, 2010; Berland *et al.*, 2011). Como el uso de Percoll® presenta el riesgo de contaminación con endotoxinas (Henkel y Schill, 2003), se recomienda el lavado de los espermatozoides seleccionados lo cual puede inducir daños en las células, así como necesidad de prolongar el tratamiento de la muestra. Debido a la posible toxicidad del Percoll® y que aun no se han obtenido preñeces con embriones producidos *in vitro* es que en nuestro laboratorio se estudió la implementación de un método de selección de espermatozoides con un medio diferente. El Androcoll-ETM es un coloide que se utiliza para seleccionar espermatozoides equinos normales y móviles tanto en semen fresco, como en semen refrigerado y congelado-descongelado (Morrel *et al.*, 2009). En un primer estudio se estudió si era posible seleccionar espermatozoides de llama móviles utilizando Androcoll-ETM (Santa Cruz *et al.*, 2010). Las muestras de semen se incubaron en una solución de colagenasa al 0,1% en H-TALP-BSA y se centrifugaron 8 min a 800 g para disminuir la filancia del plasma seminal (Giuliano *et al.*, 2010). El pellet obtenido se rediluyó en 2 ml de H-TALP-BSA, se sembró en una columna de 2 ml de Androcoll-ETM y se centrifugó a 600 g por 20 min. El pellet obtenido se rediluyó en 0,5 ml de Fertil-TALP y se evaluó concentración espermática, movilidad y viabilidad espermática mediante los fluorocromos diacetato de 6-carboxifluoresceína e ioduro de propicio (CFDA/Pi). Se obtuvieron pellets con un rango de 10 a 40 x 10⁶

espermatozoides/ml, con un 20 a 60% de movilidad progresiva y 20 a 80% de espermatozoides vivos. Los resultados obtenidos indicaron que era posible seleccionar espermatozoides de llama con movilidad progresiva mediante el uso de Androcoll-ETM.

En un siguiente estudio se comparó la técnica de swim up con el método de gradiente de densidad-centrifugación utilizando columnas de Androcoll-ETM y de Percoll® al 45% (Santa Cruz *et al.*, 2011). Con los gradientes de centrifugación utilizados se pudieron obtener porcentajes de movilidad progresiva y de espermatozoides con membrana funcional significativamente superiores respecto al fresco ($p \leq 0.05$). No así con el tratamiento con swim up. Según estos resultados los métodos de selección espermática mediante centrifugación a través de un coloide serían los de elección para obtener una muestra con mayor movilidad espermática y membranas funcionales para poder realizar fertilización *in vitro*. Es de destacar que seleccionando espermatozoides mediante centrifugación a través del coloide Androcoll-ETM se han obtenido embriones de eyaculado de llama mediante la técnica de fertilización *in vitro* (Trasorras *et al.*, 2010).

Referencia Bibliográfica

- Berland, M.A., von Baer, A., Ruiz, J., Parraguez, V., Morales, P., Adams, G.P., Ratto, M.H., 2011. *In vitro* fertilization and development of cumulus oocyte complexes collected by ultrasound-guided follicular aspiration in superstimulated llamas. *Theriogenology* 75: 1482-1488.
- 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. *In vitro* production of llama embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Anim. Reprod. Sci.* 109: 298-308.
- Condori, R.L., Huanca, W., Chileno, M., Cainzo, J., Valverde, F., Becerra, J.J., Quintela, L.A., Herradon, P.G., 2010. Effect of follicle-stimulating hormone addition on *in vitro* maturation and cleavage of alpaca (*Vicugna pacos*) embryos. *Reproduction, Fertility and Development* 23: 224.
- Del Campo, M. R., Del Campo, C. H., Donoso, M. X., Berland, M., Mapletoft, R.J. 1994. *In vitro* fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology* 41: 1219-1229.
- Gamarra, G., Huaman, E., León, S., Carpio, M., Alvarado, E., Asparrin, M., Vivanco, W. 2008. First *In Vitro* Embryo Production In Alpacas (*Lama Pacos*). *Rep. Fert. Development* 21: 177-178
- Giuliano S., Carretero, I., Gambarotta, M., Neild, D., Trasorras, V., Pinto, M., Miragaya, M. 2010. Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Ani. Reprod. Science* 118: 98-102.
- Henkel R., Schill W. 2003. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1: 108
- Huanca, W., Cordero, A., Huanca, T., Cardenas, O., Adams, G.P., Ratto, M.H. 2009. Ovarian response and embryo production in llamas treated with equine chorionic gonadotropin alone or with a progestin-releasing vaginal sponge at the time of follicular wave emergence. *Theriogenology* 72: 803-808.
- Huanca, W., Condori, R., Cainzos, J., Chileno, M., Quintela, L., Becerra, J., Herradon, P.G. 2010. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of alpaca (*Vicugna pacos*) oocytes: effect of time of incubation on nuclear maturation and cleavage. *Reproduction, Fertility and Development* 22: 327.
- Mendoza, J., Ayuque, A., Triviño, F., Ayuque, G., Landeo, L., Ratto, M., Correa, J., Ruiz, J. 2009. Evaluación de dos métodos de recuperación de espermatozoides epididimarios para la fecundación *in vitro* de ovocitos de alpaca. *V Congreso Mundial sobre Camélidos*. Riobamba, Ecuador.
- Miragaya, M.H., Herrera, C., Quintans, C.J., Chaves, M.G., Capdevielle, E.F., Giuliano, S.M., Pinto, M.R., Egey, J., Rutter, B., Pasqualini, R.S., Agüero, A. 2003. Producción *in vitro* de embriones de llama (*Lama glama*) por la técnica de ICSI: resultados preliminares. *Proc. III Congreso Mundial sobre Camélidos*, Bolivia: 267-270.
- Morrell, J.M., Johannisson, A., Strutz, H., Dalin, A.M., Rodríguez-Martínez, H. 2009. Colloidal centrifugation of stallion semen: changes in sperm motility, velocity, and chromatin integrity during storage. *Journal of Equine Veterinary Science* 29(1): 24-32.
- Trasorras, V., Giuliano, S.M., Chaves, M.G., Baca Castex, C., Carretero, M.I., Negro, V., Rodríguez, D., Miragaya, M.H. 2010. *In vitro* production of llama embryos. *InVet.* 12(2): 296.