

USO DE COLAGENASA MEJORA LAS CARACTERISTICAS SEMINALES DE LLAMA (*Lama glama*)

S. M. Giuliano y C. Casaretto

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

El interés creciente en las especies de Camélidos Sudamericanos (CSA) ha motivado el desarrollo y puesta a punto de diversas biotecnologías reproductivas, con el objetivo de acelerar la propagación de animales seleccionados ya sea por su morfología y morfometría como por la calidad y cantidad de su fibra.

El eyaculado de los Camelidos Sudamericanos (CSA) es filante y muy viscoso. La filancia puede definirse como la capacidad de un fluido de extenderse hasta formar hilos. A su vez un fluido viscoso es aquel en el cual existen fuerzas de atracción entre porciones adyacentes del fluido. Estas fuerzas definen el comportamiento del flujo, el cual puede ser estudiado mediante un reograma, un gráfico de fuerza de corte (en función de la velocidad de corte). La pendiente a cada velocidad de corte en el reograma representa los valores de viscosidad, denominada viscosidad aparente (Mendeluk *et al.*, 2000). Por lo tanto, cuando el eyaculado de los CSA se pipetea, se forma un hilo de extensión (Giuliano *et al.*, 2010), la cual ha sido atribuida a la presencia de mucopolisacáridos en las secreciones de las glándulas bulbouretrales ya que en animales bulbourectomizados la viscosidad es baja, similar a la de la solución fisiológica (González *et al.*, 2003). En nuestro laboratorio no se observó disminución de la filancia de semen de llama por efecto del transcurso del tiempo ni por acción de la temperatura (Giuliano, observación personal).

Además, los espermatozoides de CSA presentan, en el eyaculado, solamente movimientos en el lugar y no progresivos (Giuliano *et al.*, 2010). Para obtener embriones mediante las técnicas de fertilización asistida FIV e ICSI es necesario que los espermatozoides tengan movilidad progresiva y también es necesario poder separar a los espermatozoides del plasma seminal y poder separar a los espermatozoides móviles de los inmóviles.

Se han utilizado diferentes enzimas para mejorar las características reológicas del plasma seminal con resultados variados. Bravo *et al.* (1999) incubaron eyaculados de alpaca en soluciones acuosas de tripsina y colagenasa, pero aunque observaron una disminución de la viscosidad también observaron una disminución del porcentaje de movilidad espermática. En otra experiencia, Bravo *et al.* (2000) observaron que las enzimas tripsina, colagenasa, hialuronidasa y fibrinolisisina son efectivas para disminuir la viscosidad del semen de alpaca y llama, pero no consiguieron que los espermatozoides adquiriesen movilidad progresiva. A su vez, Maxwell *et al.*, (2008), observaron que el uso de colagenasa en todas las concentraciones que testearon. Estas características del semen dificultan el manejo apropiado de los espermatozoides *in vitro* y han demorado el desarrollo de técnicas de fertilización asistida en los CSA. De tal forma Del Campo *et al.* (1994) descartaron utilizar eyaculados de llama y utilizaron espermatozoides de epidídimo para realizar ensayos de FIV y Sancinena *et al.* (2007) descartaron la obtención de embriones por FIV y realizaron solamente la técnica de ICSI por el manejo complicado del semen debido a las características del mismo: filancia del plasma seminal y falta de movilidad progresiva espermática. Además los últimos reportes de producción de embriones *in vitro* han sido utilizando espermatozoides de epidídimo (Gomez *et al.*, 2002; Gamarra *et al.*, 2008; Huanca *et al.*, 2009; Huanca *et al.*, 2010; Condori *et al.*, 2010; Berland *et al.*, 2011).

En nuestro laboratorio se estudiaron protocolos de mejoramiento de las características del semen de llama utilizando una solución de colagenasa al 0,1% en H TALP BSA, que preservaron la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Giuliano *et al.*, 2010) y permitieron producir embriones *in vitro* (Conde *et al.*, 2008; Trasoras *et al.*, 2010).

Con los tratamientos enzimáticos utilizados en nuestro laboratorio se disminuyó la filancia del plasma seminal, se incrementó la movilidad progresiva espermática y se conservó la integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides.

La disminución de la filancia se observó en el 100% de las muestras tratadas enzimáticamente. Este resultado podría atribuirse a la acción de la colagenasa y no a un efecto dilución o efecto del tiempo de incubación, ya que en las muestras incubadas a 37°C, con 4: 1 y 8: 1 en H-TAL-BSA (sin colagenasa) por 4 y 8 min respectivamente, no se observó esta disminución de la filancia. Con ambos tratamientos enzimáticos se obtuvo un aumento en el porcentaje de movilidad progresiva pasando de una media y una mediana de 5,7 y 0 % en el semen fresco, a una media y mediana igual o mayor al 40 % y, en contraposición, una fuerte disminución del porcentaje de movilidad en el lugar. Este aumento en el porcentaje de movilidad progresiva solo se observó en

las incubaciones con colagenasa en medio H-TALP-BSA y no en las incubaciones realizadas en medio H-TALP-BSA sin colagenasa. Por lo tanto podría atribuirse a una acción indirecta de la colagenasa al disminuir la filancia del semen.

Se ha observado, en semen humano, que el plasma seminal con hiperviscosidad puede causar astenozoospermia. En trabajos posteriores, Mendeluk *et al.* (2000) han sugerido la existencia, en el plasma seminal, de una red fuertemente organizada compuesta por puentes disulfuros, cadenas de oligosacáridos y péptidos responsables de las características reológicas encontradas en eyaculados con alta viscosidad. También han sugerido que estas moléculas, que serían responsables del comportamiento reológico de la hiperviscosidad, pueden jugar un rol clave en la fisiología espermática y, por ende, en la movilidad del espermatozoide.

En este estudio no hubo aumento significativo en el porcentaje de cabezas sueltas en ninguno de los 4 tratamientos; esto estaría indicando que tanto las concentraciones utilizadas de colagenasa en H-TALP-BSA, como los tiempos y velocidades de centrifugación, no inducirían un daño mecánico en los espermatozoides.

Si bien la viscosidad del semen ha sido evaluada en términos subjetivos (González *et al.*, 2003; Bravo *et al.*, 1999; Bravo *et al.*, 2000), mediante aspiración suave con pipeta Pasteur y observando la longitud del filamento formado (González *et al.*, 2003; Bravo *et al.*, 1999), esta técnica estima en realidad la filancia de la muestra

En nuestro laboratorio se evaluó el efecto de la colagenasa en una concentración de 1/8 sobre la viscosidad del eyaculado evaluada objetivamente (Casaretto *et al.*, 2011).

Cuando se evaluaron los parámetros reológicos en 23 muestras con o sin incubación con colagenasa no se encontraron diferencias para la viscosidad estructural (K). A pesar de que no se observaron diferencias significativas de viscosidad estructural (K) entre muestras de semen tratadas y no tratadas enzimáticamente, las muestras tratadas no formaron hilo al pipetear, mientras que las muestras no tratadas si formaron hilo. Esto demuestra que la incubación de semen en la solución de colagenasa afecta la formación de hilo (filancia), pero no la viscosidad del semen. Esto también confirma que la viscosidad es una característica diferente de la capacidad de formar de hilo o filancia, teniendo en cuenta que la viscosidad no ha cambiado en las muestras tratadas, sino que se observó una variación en la formación de hilo. Por lo tanto, la formación de hilo no se debe utilizar para evaluar la viscosidad del semen.

Los resultados obtenidos en estos estudios contribuirán a una comprensión más completa de la fisiología reproductiva masculina de los Camélidos Sudamericanos promoviendo así el desarrollo de biotecnologías reproductivas en estas especies.

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.
- Bravo, P.W., Pacheco, C., Quispe, G., Vilcapaza, L., Ordoñez, C. (1999) Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. *Archives of Andrology* 43: 239-246.
- Bravo, P.W., Ccallo, M., Garnica, J. 2000. The effect of enzymes on semen viscosity in Llamas and Alpacas. *Small Ruminant Research* 38: 91-95.
- Casaretto, C., Martínez Sarrasague, M., Giuliano, S., Rubin de Celis, E., Gambarotta, M., Carretero, I., Miragaya, M. 2011. Evaluation of *Lama glama* semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer. *Andrologia*, DOI: 10.1111/j.1439-0272.2011.01186.x.
- 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 Dev.* 23: 224.
- Del Campo, M. R., Del Campo, C. H., Donoso, M. X., Berland, M., Maplettoft, 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.
- González, V., Copa, S., Ochoa, R. 2003. Efecto de la bulbouretrectomía y la periodicidad de colección en las características microscópicas y microscópicas del eyaculado en llamas de tres edades. *III Congreso Mundial sobre Camélidos*, Tomo II: 743-746.
- 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 progesterin-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.
- Maxwel, C., Evans, G., Morton, K. M. 2008. The Development of Collection, Processing and Storage Technologies for Alpaca Semen. *Extender abstracts WBC / ICAR Satellite Meeting on Camelid Reproduction*, p. 19-25.
- Mendeluk, G., González F., F.L., Castello, P., Bregni, C. 2000. Factors involved in the biochemical etiology of human seminal plasma hyperviscosity. *J. of Androl.* 21: 262-267
- 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 In: *Vet.* 12(2): 296.