

Artículo de Revisión
EFFECTO DEL PLASMA SEMINAL EN LOS PATRONES DE MOVILIDAD ESPERMÁTICA Y SU RELACIÓN CON LA CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN DE LLAMA

Effect of seminal plasma on the sperm motility patterns and their relationship to the cryopreservation of llama semen

Fernanda Gabriela Fumuso^{1,3,4}, María Ignacia Carretero^{1,3,4}, Marcelo Miragaya^{1,3},
Susana María Giuliano^{2,3}

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.43>

¹ Cátedra de Teriogenología

² Cátedra de Física Biológica,

³ Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

⁴ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina.

E-mail: smgiulia@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La pregunta que nos hacemos todos los que trabajamos en camélidos sudamericanos (CSA) es "¿Porqué si se insemina con la misma cantidad de espermatozoides motiles/vivos no se preña con semen criopreservado y si con el semen fresco?". La criopreservación de gametos permite conservar el material genético de reproductores de alta calidad genética por tiempo ilimitado y además permite transportar este material a lugares distantes de donde se encuentre el reproductor. La criopreservación de semen de camélidos sudamericanos (CSA) no ha tenido el mismo éxito que se ha observado en la especie bovina. Tanto en la llama como en la alpaca, aún se insemine con semen criopreservado el mismo número de espermatozoides vivos y móviles que con semen fresco, se obtienen muy bajos porcentajes de preñez (0 al 26%) (Bravo *et al.*, 2000a; Aller *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2003; Huanca *et al.*, 2007; Giuliano *et al.*, 2012a). Como consecuencia de esta situación, no hay campañas masivas de inseminación artificial (IA) con semen criopreservado. Diversos protocolos se han desarrollado con el fin de mejorar los resultados post-descongelado. Con respecto a los crioprotectores penetrantes, el glicerol al 7% (equilibrado a 5 °C) ha sido prácticamente el único crioprotector empleado (Bravo *et al.*, 2000a; Aller *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2003; Santiani *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2010). En menor medida se ha probado etilenglicol en alpacas (Santiani *et al.*, 2005; 2013). En nuestro laboratorio, determinamos que el equilibramiento a temperatura ambiente y el uso de dimetilformamida al 7% como crioprotector penetrante, conservó la movilidad, viabilidad e integridad funcional de la membrana plasmática espermática y a su vez conservó la integridad y condensación de la cromatina de los espermatozoides de llama (Carretero *et al.*, 2014). En el mismo trabajo, utilizando glicerol al 7%, observamos que un 87-100% de los espermatozoides tenían el ADN fragmentado. Hasta la actualidad, la mayoría de los estudios realizados sobre criopreservación de semen de CSA se han centrado en determinar los efectos de diferentes crioprotectores y concentraciones de los mismos, temperaturas de equilibramiento y curvas de congelamiento sobre la viabilidad y la movilidad espermática.

INTRODUCTION

Everyone who work with camelids ask themselves “Why the pregnancy rate is higher using fresh semen versus frozen semen?”, This results are obtain even when the same amount of motile and viable spermatozoa are use in the artificial insemination. Gamete cryopreservation preserves the genetic material of males with superior genetic quality for unlimited time and also it allows the transport of this material to distant places where the males are located. Cryopreservation of South American Camelids (SAC) semen, didn't had the same success that has been observed in cattle. Low pregnancy rates are obtain in llamas and alpacas when they are inseminated with frozen thawed spermatozoa (0 to 26%), even when the same amount of live and motile spermatozoa are inseminated compared to fresh semen used (Bravo *et al.*, 2000a; Aller *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2003; Huanca *et al.*, 2007; Giuliano *et al.*, 2012a). Because of these results no massive campaigns of artificial insemination (AI) with frozen/thawed semen are performed. Several protocols have been developed in order to improve outcomes, different cryoprotectants like glycerol 7% had been tested and is [practically the most used in cryopreserved semen (Bravo *et al.*, 2000a; Aller *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2003; Santiani *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2010). A small use has been giving to ethylene glycol but is been tested in alpaca semen (Santiani *et al.*, 2005; 2013). In our laboratory, we determine that the equilibration at room temperature using dimethylformamide (7%) as a penetrating cryoprotectant can preserve motility, viability and membrane functional integrity of llama spermatozoa (Carretero *et al.*, 2014). In this same work, we found 87-100% of sperm with fragmented DNA using glycerol 7% as cryoprotectant. To the present, most studies on cryopreservation of camelids semen have focused on determining the effects of different cryoprotectants and concentrations, temperature equilibration and freezing curves on the viability and motility sperm.

ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

Es de resaltar que no hay muchos estudios sobre el efecto de la dilución del plasma seminal (PS) en las muestras criopreservadas. El PS de los CSA tiene características particulares que se tendrían que tener en cuenta para poder contar con protocolos de criopreservación de semen que permitan obtener tasas aceptables de preñez mediante inseminación artificial (IA) (Giuliano *et al.*, 2010; Apichela *et al.*, 2014; Kershaw-Young *et al.*, 2013). Dos de las más importantes características que presenta el PS, son su capacidad de formar hilo cuando se lo pipetea y de presentar viscosidad estructural alta (Casaretto *et al.*, 2012). Con respecto al manejo del semen, estas características reológicas, dificultan en extrema medida la separación de los espermatozoides del

plasma, la dilución del eyaculado, la homogeneidad de las muestras, la separación en alícuotas y el envasado en pajuelas (Tibary y Vaughan 2006; Kershaw-Young *et al.*, 2013, Carretero *et al.*, 2014). Diferentes enzimas (tripsina, colagenasa, fibrinolisisa, hialuronidasa, papaína) se han utilizado para disminuir la viscosidad del plasma seminal en CSA con resultados variables (Bravo *et al.*, 1999; 2000b; Giuliano *et al.*, 2010; Kershaw-Young *et al.*, 2013).

La incubación del semen de CSA con una solución de colagenasa en Hepes-TALP demostró ser eficaz para eliminar la filancia de las muestras, separar los espermatozoides del plasma seminal e inducir movilidad espermática progresiva (Giuliano *et al.*, 2010) y así conseguir la primera preñez a nivel mundial a partir de embriones obtenidos mediante fertilización in vitro (Trasorras *et al.*, 2014). Con respecto a la composición bioquímica del PS de los CSA, se observó que las proteínas totales, lípidos, glucosa, iones cloro y calcio, presentaron concentraciones similares a las observadas en el toro y en el carnero y que la proteína mucina 5B sería probablemente la responsable de la filancia y viscosidad del PS (Kershaw-Young *et al.*, 2012). Además se ha demostrado la presencia de un factor inductor de la ovulación (OIF) y luteotrófico en el PS tanto de alpacas como de llamas, con el cual se obtuvieron tasas de ovulación superiores al 90% al inyectar PS por vía intramuscular (Ratto *et al.*, 2005).

En investigaciones recientes en alpacas, se determinó que el OIF es un factor de crecimiento nervioso beta (β -NGF), con el que se obtuvo la misma efectividad que con análogos de GnRH sobre la ovulación de folículos preovulatorios (Kershaw-Young *et al.*, 2012). Con respecto al efecto de la presencia del plasma seminal en el proceso de refrigeración del semen, en nuestro laboratorio observamos que el porcentaje de movilidad de muestras diluidas (1:1) con un diluyente a base de lactosa y yema de huevo) y refrigeradas con PS fue significativamente menor al porcentaje de las muestras refrigeradas sin PS (Santa Cruz *et al.*, 2012). Con respecto a la cromatina espermática, observamos que el porcentaje de descondensación de la cromatina fue mayor en las muestras refrigeradas sin PS respecto de las refrigeradas con PS (Carretero, datos no publicados) y que la fragmentación del ADN no aumentó en las muestras refrigeradas, tanto en presencia como en ausencia de PS (Carretero *et al.*, 2012). No se conoce todavía en su real medida la función del PS con respecto a la fisiología espermática de estas especies. Como los espermatozoides del eyaculado fresco de CSA no tienen movilidad progresiva y solamente presentan movilidad oscilatoria, se le ha atribuido al PS una acción mecánica que no dejaría avanzar a los espermatozoides (Bravo 2000b). Sin embargo, estudios recientes han sugerido que la falta de movilidad progresiva no sólo se debería a una acción

mecánica, sino a un efecto más complejo (Giuliano *et al.*, 2010a, 2012a; Carretero *et al.*, 2014, 2015).

En espermatozoides de epidídimo y de eyaculados de alpaca, incubados durante 6 horas con diferentes concentraciones de PS, se observó que una concentración final de 10 % de PS conservaba la movilidad espermática, preservaba la integridad acrosómica y mantenía la viabilidad (Kershaw-Young y Maxwell, 2011). En otro reporte, Apichela *et al.* (2014) observaron que el PS participa en la formación de reservorios espermáticos en la unión útero-tubárica y que luego de 28 horas post-servicio los espermatozoides se liberan del reservorio. Dado que las hembras de CSA son ovuladoras inducidas y que en la llama la ovulación se produce a las $28,6 \pm 0,4$ horas post-administración exógena de LH o de análogos de GnRH (Bourke *et al.*, 1992), la liberación de los espermatozoides del reservorio coincidiría con el momento de la ovulación. Por lo tanto, la dilución o tratamiento enzimático del PS podrían estar alterando o impidiendo la formación de reservorios espermáticos en el oviducto y esto podría ser un factor importante a tener en cuenta al desarrollar protocolos de conservación de semen. Es de interés remarcar que, en un estudio realizado por Carretero *et al.* (2015), se observó hipermovilidad en muestras de semen fresco diluidas en medio Hepes-TALP en ausencia de PS, mientras que en las muestras con 100% de PS sólo se observó movilidad oscilatoria evidenciando así que la ausencia del PS produce un cambio en el patrón de movilidad de los espermatozoides de llama.

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad ni en el porcentaje de espermatozoides con sus acrosomas intactos entre las muestras con 0 y 100% de PS (Carretero *et al.*, 2015). Con respecto al congelamiento de semen de llama con diferentes porcentajes de PS, no se han encontrado diferencias significativas ($p < 0.05$) en las diferentes variables seminales evaluadas entre las muestras criopreservadas con diferentes porcentajes de PS (0%; 10%; 50%), además se presentaron dificultades para homogeneizar y envasar las muestras con PS (Fumuso no publicado). En otro estudio, evaluamos el efecto de la dimetilformamida (al 4 y 7%) y del tratamiento enzimático del PS, 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 (Flores *et al.*, 2015).

Con respecto al efecto del PS en espermatozoides de otras especies, se ha reportado que la dilución del mismo parecería producir capacitación, o un proceso similar a la

capacitación, (Watson, 1995; Neild *et al.*, 2003; Silva y Gadella, 2006). Además se ha observado que los espermatozoides de varias especies evidencian cambios similares a los de la capacitación luego de la refrigeración y del congelamiento profundo, efecto que se ha llamado "criocapacitación" (ratón: Fuller y Whittingham, 1996; carnero: Pérez *et al.*, 1996; Gillan *et al.*, 1997; cerdo: Maxwell y Johnson, 1997; toro: Cormier *et al.*, 1997; equino: Neild *et al.*, 1999; 2003). Se desconoce si este efecto ocurriría en espermatozoides de llama y en los demás CSA. Respeto a los beneficios de la presencia o ausencia del PS en la preservación del semen de otras especies, la literatura presenta resultados controvertidos (Maxwell y Johnson, 1999; López-Pérez y Pérez-Clariget, 2012; Juyena y Stelleta 2012).

CONCLUSIONES

Por lo anteriormente mencionado, en los CSA la presencia del PS no permite un buen manejo del semen, dificultando la interacción de los espermatozoides con los crioprotectores y el envasado de las pajuelas, por lo tanto se hace necesario un tratamiento enzimático que posibilite el manejo de las muestras a criopreservar. Por otra parte, la dilución o tratamiento enzimático de los eyaculados podría modificar el patrón de movilidad de los espermatozoides, interferir en la interacción oviducto-espermatozoide y favorecer fenómenos de membrana similares a la capacitación, comprometiendo el encuentro de los gametos en el oviducto. Teniendo en cuenta que hasta la actualidad no hay un protocolo de criopreservación de semen de CSA que permita obtener preñez, es de interés realizar más estudios para conocer los efectos o influencia de la dilución del plasma seminal en la fisiología y criopreservación del espermatozoide de llama.

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.
- Apichela SA, Argañaraz ME, Giuliano SM, Zampini R, Carretero MI, Miragaya M, Miceli DC. Llama oviductal reservoirs: involvement of bulbourethral glands. Andrología, 2014; 46(3): 290-295.
- Bourke DA, Adam CL, Kyle CE, McEvoy TG, Young P. Ovulation, superovulation and embryo recovery in llamas. Proc. 12th Int. Cong. Animal Reproduction, 1992; 1, 193-195.
- Bravo PW, Pacheco C, Quispe G, Vilcapaza L, Ordoñez C. Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. Arch. Androl. 1999; 43, 239-246.

- Bravo PW, Skidmore JA, Zhao XX. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Ani. Reprod. Sci.* 2000a; (62): 173-93.
- Bravo PV, Callo P, Garnica J. The effect of enzymes on semen viscosity in Llamas and Alpacas. *Small Rumin. Res.* 2000b; 38, 91-95.
- Carretero MI, Santa Cruz RC, Arraztoa CC, Giuliano SM, Neild D. Effect of cooling on llama sperm DNA. *Invet*, 2012a; 14(1): 260.
- Carretero MI, Neild D, Ferrante A, Caldevilla M, Arraztoa C, Fumuso FG, Giuliano S. Effect of cryoprotectant and equilibration temperature on *Lama glama* sperm cryopreservation. *Andrología*, 2014; 47(6): 685-693.
- Carretero MI, Fumuso F, Miragaya M, Herrera C, Giuliano S. Effect of seminal plasma in *Lama glama* sperm. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2015; 27(1): 223. 41 st Annual Conference of the International Embryo Transfer Society. January, 10-13, Versailles, Francia.
- Casaretto C, Martínez Sarrasague M, Giuliano S, Rubin de Celis E, Gambarotta M, Carretero MI, Miragaya M. Evaluation of *Lama glama* semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer. *Andrologia*, 2012; 44: 335-341.
- Cormier S, Sirard MA, Bailey JL. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J. Androl.* 1997; 18: 461-468.
- Flores N, Cucho H, Carretero I, Ciprián R, Quispe H, Calderón N, Miragaya M, Giuliano S. Efecto del crioprotector dimetilformamida sobre la movilidad de espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) criopreservados evaluados mediante el sistema de análisis ISAS®. *SpermoVA*, 2015; 5(1):47-50.
- Fuller SJ, Whittingham DG. Effect of cooling mouse spermatozoa to 4° C on fertilization and embryonic development. *J. Reprod. Fertil.* 1996;108: 139-145.
- Gillan L, Evans G, Maxwell WM. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 1997; 9: 481-487.
- Giuliano S, Carretero MI, Gambarotta M, Neild D, Trasorras V, Pinto M, Miragaya M. Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Anim. Reprod. Sci.* 2010a; 118 (1): 98-102.
- Giuliano SM, Chaves MG, Trasorras VL, Gambarotta M, Neild D, Director A, Pinto M, Miragaya MH. Development of an artificial insemination protocol in llamas using cooled semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 2012a; 131: 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 (1): 195-201.
- Juyena NS, Stelletta C. Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa Review. *J. Androl.*, 2012; 33 (4): 536-551.
- Kershaw-Young CM, Maxwell WMC. The effect of seminal plasma on alpaca sperm function. *Theriogenology*, 2011; 76: 1197-1206.
- Kershaw-Young CM, Maxwell WMC. Seminal plasma components in Camelids and Comparisons with other species. *Reprod. Dom. Anim.*, 2012; 47(4): 369-375.
- Kershaw-Young CM, Stuart C, Evans G, Maxwell WMC. The effect of glycosaminoglycan enzymes and proteases on the viscosity of alpaca seminal plasma and sperm function. *Anim. Reprod. Sci.*, 2013; 138: 261-267.
- López-Pérez A, Pérez-Clariget R. Ram seminal plasma improves pregnancy rates in ewes cervically inseminated with ram semen stored at 5 °C for 24 hours. *Theriogenology*, 2012; 77(2):395-399.
- Maxwell WMC, Johnson LA. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.* 1997; 46: 408-418.
- Maxwell WM, Johnson LA. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, 1999; 52(8):1353-1362. Review.
- Morton KM, Evans G, Maxwell WM. Effect of glycerol concentration, Equex STM supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology*, 2010; 74 (2): 311-316.
- Neild DM, Chaves MG, Flores M, Mora N, Beconi MT, Agüero A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 1999; 51: 721-727.
- Neild DM, Bart M, Gadella M, Chaves G, Miragaya MH, Colenbrander B, Aguero A. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*, 2003; 59: 1693-1705.
- Pérez LJ, Valcárcel A, de las Heras MA, Moses D, Baldassare H. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology*, 1996; 46(1): 131-140.
- Ratto MH, Wanca W, Singh J, Adams GP. Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2005; 3: 29-44.
- Santiani A, Huanca W, Sapana R, Huanca T, Sepúlveda N, Sánchez N. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian Journal of Andrology*, 2005; 7 (3): 303-309.
- Santiani Acosta A, Evangelista Vargas S, Valdivia Cuya M, Risopatrón González J, Sánchez Gutiérrez R. Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. *Theriogenology*, 2013; 79: 842-846.

- Santa Cruz CR, Arraztoa CC, Carretero MI, Ferrante A, Caldevilla M, Moncalvo E, Giuliano S. Sperm selection in llama cooling semen using different gradients of percoll®. *Invet*, 2012a;14(1): 298.
- Silva PFM, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 2006; 65: 958-978.
- Tibary A, Vaughan J. Reproductive physiology and infertility in male South American Camelids: A review and clinical observations. *Small Rumin. Res.*, 2006; (61): 283-298.
- Trasorras VL, Baca Castex C, Alonso A, Giuliano S, Santa Cruz R, Arraztoa C, Chaves G, Rodríguez D, Neild D, Miragaya M. First llama (*Lama glama*) pregnancy obtained after *in vitro* fertilization and *in vitro* culture of gametes from live animals. *Anim. Reprod. Sci.*, 2014; 148(1-2): 83-89.
- Vaughan J, Galloway D, Hopkins D. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). RIRDC Rural Industries Research and Development Corporation, Pub. 2003; N° 03/104, Kingston, Australia.
- Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 1995; (7): 871.