

SELECCIÓN ESPERMÁTICA DE SEMEN REFRIGERADO DE LLAMA CON DILUYENTE A BASE DE YEMA DE HUEVO

Sperm selection in cooled llama semen with egg yolk extender

S. Giuliano^{1*}, R. Santa Cruz², C. Arraztoa^{1,2}, F.G. Fumuso^{1,2,3}, M. Bertuzzi^{1,2,3}, M.I. Carretero M^{1,2,3*}

- ¹ Universidad de Buenos Aires,
Facultad de Ciencias
Veterinarias, Instituto de
Investigación y Tecnologías
Reproductivas (INITRA),
² Cátedra de Teriogenología,
³ Consejo Nacional de
Investigaciones Científicas y
Técnicas (CONICET). Buenos
Aires, Argentina.

* Corresponding authors:

Dra Susana María Giuliano
E-mail: smgiulia@gmail.com

Dra María Ignacia Carretero
E-mail:
ignaciacarretero@gmail.com

ABSTRACT

The objective of the study was to separate motile and with functional membrane integrity sperm from diluents in cooled llama semen. A total of 21 ejaculates from 7 llama males were obtained and cooled with the follow methodology. Each sample was incubated with collagenase 0.1% and then divided in two aliquots: R- diluted 1:2 with a lactose-egg yolk diluent (L-E) and Rc- centrifugated at 800 g and the pellet resuspended in L-E diluent. Both samples where them cooled at 5 °C during 24 h. Three different methodologies were used to separate sperm from diluents; Androcoll-E-Large, Percoll® (45%, 45%-70%, 45%-80%, 45%-90% y 60%-90%) and swim up. Motile llama sperm with lower amount of egg yolk was obtain only when using Percoll® 45%, 45%-70%, 45%-80%. After this the remaining samples (14 ejaculates) where processed with the following methods. Raw semen was cooled with seminal plasma (R) and without it (Rc), with the following final treatments; Percoll® 45/70 (R70), 45/80 (R80) and Percoll® 45/70 (Rc70) y 45/80 (Rc80). When sperm variables showed statistical normality results were analyzed with a factorial design, if not a Friedman test was used. The Percoll® Rc80 was the one that separated higher motile and alive sperm free from the diluent compared with the other treatments evaluated. To conclude, this protocol can be used to process cooled llama sperm to apply in assisted reproduction biotechnologies.

Keywords: cooled semen, sperm selection, llama

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue obtener espermatozoides móviles, libres de diluyente y con integridad funcional de la membrana plasmática a partir de eyaculados refrigerados de llama. Se refrigeraron un total de 21 eyaculados de 7 machos mediante la siguiente metodología: cada muestra se incubó en una solución de colagenasa al 0,1 % y se dividió dos alícuotas: R: se la diluyó 1:2 con un diluyente en base a lactosa-yema de huevo (L-Y) y Rc: se centrifugó a 800g y el pellet obtenido se resuspendió en 2 ml de L-Y. Ambas muestras se refrigeraron durante 24 hs a 5° C. En 7 eyaculados se probaron las siguientes metodologías: Androcoll-E-Large, Percoll® (45%, 45%-70%, 45%-80%, 45%-90% y 60%-90%) y swim up. Solamente los gradientes de Percoll® 45%-70% y 45%-80% permitieron obtener una fracción de espermatozoides móviles con una menor cantidad de yema, consecuentemente en los restantes 14 eyaculados se realizó el siguiente experimento: refrigerado con plasma seminal (R): Percoll® 45/70 (R70) y 45/80 (R80) y refrigerado sin PS (Rc): Percoll® 45/70 (Rc70) y 45/80 (Rc80). En las variables espermáticas en las que se logró normalidad se utilizó un diseño factorial y en el resto se utilizó el test de Friedman. El gradiente de Percoll® 45/80 realizado en muestras de espermatozoides refrigerados sin plasma seminal (Rc80) fue el que permitió obtener una muestra con un número suficiente de espermatozoides refrigerados móviles, libre de diluyente y con mayor porcentaje de espermatozoides vivos respecto al resto de los gradientes. Por lo tanto, es posible utilizar esta metodología en la preparación de espermatozoides refrigerados de llama para utilizar en protocolos de fertilización asistida.

Palabras clave: semen refrigerado, selección espermática, llama.

INTRODUCCION

Como es de conocimiento, el semen de los camélidos sudamericanos (CSA) presenta características particulares como elevada viscosidad estructural (Casaretto et al., 2012) y alta filancia; por eso, al pipetearlo se forma un hilo de longitud variable (Giuliano et al., 2010; Carretero et al., 2012). Además, existe una alta variabilidad en los diferentes parámetros seminales entre machos e incluso entre eyaculados de un mismo macho (Giuliano et al., 2008). Debido a las características reológicas no es posible separar los espermatozoides del plasma seminal (PS) sino se utiliza un tratamiento enzimático previo o varias centrifugaciones a elevada velocidad (Giuliano et al., 2010; Kershaw - Young y Maxwell 2011; Fumuso et al., 2018). Además, estas características reológicas dificultan la evaluación de los eyaculados, el fraccionamiento de los mismos en alícuotas, la homogeneización de las muestras diluidas y el envasado de las pajuelas (Sansinena et al., 2007, Huanca et al., 2007; Carretero et al., 2015; Santa Cruz et al., 2016). Por otra parte, los espermatozoides de estas especies presentan movilidad oscilatoria y no progresiva en los eyaculados (Giuliano et al., 2010; Fumuso et al., 2018). Debido a estas características seminales particulares es que la mayoría de los reportes de producción de embriones in vitro se realizaron con espermatozoides de epidídimo y no con espermatozoides de eyaculado debido a que las muestras epididimarias carecen de PS y los espermatozoides tienen movilidad progresiva. Por lo tanto, ni la filancia ni la viscosidad constituyen un problema en estas muestras (Del Campo et al., 1994; Gómez et al., 2002; Sansinena et al., 2007; Ratto et al., 2007, Gamarra et al., 2008, Huanca et al., 2009, 2010; Mendoza et al., 2009; Condori et al., 2010; Berland et al., 2011; Mamani-Mango et al., 2018). Sin embargo, la desventaja de los protocolos diseñados para seleccionar espermatozoides de epidídimo es que no se pueden utilizar en los eyaculados y que el procedimiento de castración inutiliza al animal para usarlo como reproductor.

Por lo tanto, para poder seleccionar espermatozoides frescos utilizando machos de alto valor genético se hizo necesario desarrollar protocolos en los cuales se pueda separar el PS de las células espermáticas sin dañarlas. Los dos métodos de selección espermática más utilizados en medicina humana y en el resto de las especies son el swim up y el gradiente de densidad-centrifugación. El método de swim up es el más utilizado en semen humano (Henkel y Schill, 2003). El mismo consiste en la selección de espermatozoides basado en su

capacidad para nadar. Con esta técnica se puede obtener un alto porcentaje de espermatozoides móviles y morfológicamente normales. Sus ventajas radican en el bajo costo, su fácil preparación y la no exposición de los espermatozoides a sustancias toxigénicas como lo son algunos coloides. 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 los gradientes.

Con respecto a la selección de espermatozoides de llama provenientes de eyaculados existen dos reportes de Santa Cruz et al. (2010, 2016) en los cuales se compararon diferentes métodos de selección de espermatozoides en un mismo eyaculado (swim up, Percoll® y Androcoll-ETM). En dichos trabajos se pudo observar que los métodos de selección espermáticos basados en la centrifugación a través de un coloide son los indicados para obtener una muestra con un mayor número de espermatozoides con movilidad progresiva, con membranas funcionales y morfología normal en semen fresco de llama. Estos autores observaron también, que la técnica de swim up no demostró ser eficiente en la recuperación de un número adecuado de espermatozoides con movilidad progresiva en semen fresco de llama. Recientemente, se ha logrado separar espermatozoides de semen fresco de llama del PS utilizando una columna de Androcoll-ETM mediante centrifugación a baja velocidad prescindiendo del uso de enzimas. Sin embargo, la recuperación espermática fue baja como para obtener un adecuado pellet y la movilidad observada fue mayormente de tipo oscilatorio (Bertuzzi et al., 2018a, 2018b). En la tabla 1 se pueden observar los diferentes reportes de métodos de selección de espermatozoides en CSA.

Hasta nuestro conocimiento, no hay un reporte en el cual se analice o compare diferentes métodos de selección de espermatozoides provenientes de semen refrigerado de CSA. El objetivo de este trabajo fue obtener espermatozoides móviles, libres de diluyente y con integridad funcional de la membrana plasmática a partir de eyaculados refrigerados de llama.

Tabla 1. Listado de publicaciones que utilizaron diferentes métodos de selección espermática para IVF en CSA.

Especie	Origen de las muestras de espermatozoides	Métodos de selección	Movilidad espermática progresiva(%)	Autor/ Año
Llama	Epidídimo	Percoll (90% y 45%)	No reportada	Del Campo et al. (1994)
Llama/alpaca	Epidídimo	Percoll	No reportada	Gómez et al. (2002)
Llama	Aspiración poscoital	Isotated (50% y 90%)	No reportada	Sansinena et al. (2007)
Llama/alpaca	Epidídimo	Percoll (45% y 90%)	No reportada	Ratto et al. (2007)
Alpaca	Epidídimo	Percoll (45% y 90%)	No reportada	Gamarra et al. (2008)

Llama	Electroeyaculación	Percoll (45%)	56,36 ± 17,47	Conde et al. (2008)
Alpaca	Epidídimo	Percoll (22,5% y 45%)	No reportada	Huanca et al. (2009a)
Alpaca	Epidídimo	Percoll (45 % y 90%) y swim up	No reportada	Mendoza et al. (2009)
Alpaca	Epidídimo	Percoll (45% y 22,5%)	No reportada	Huanca et al. (2010)
Alpaca	Epidídimo	Percoll (45% y 22,5%)	No reportada	Condori et al. (2010)
Llama	Epidídimo	Percoll (45% y 90%)	No reportada	Berland et al. (2011)
Llama	Electroeyaculación	Androcoll-E™	36,66 ± 15,05	Trasorras et al. (2012)
Llama	Electroeyaculación	Androcoll-E™	40,0 ± 14,1	Trasorras et al. (2014)
Llama	Electroeyaculación	Androcoll-E™	23,55 ± 16,07	Santa Cruz et al. (2016)
Llama	Electroeyaculación	Percoll (45%)	20,60 ± 19,09	Santa Cruz et al. (2016)
Llama	Electroeyaculación	Swin up	6,74 ± 9,48	Santa Cruz et al. (2016)
Llama	Electroeyaculación	Swin up	7,50 ± 7,55	Santa Cruz et al. (2016)
Llama	Electroeyaculación	Androcoll-E™	8,7 ± 11,2 (movilidad oscilatoria: 41,4 ± 15,1)	Bertuzzi et al. (2018 ^a)
Llama	Electroeyaculación	Androcoll-E™ 600g	5,0 ± 7,5 (movilidad oscilatoria: 35,0 ± 19,4)	Bertuzzi et al. (2018 ^b)
Llama	Electroeyaculación	Androcoll-E™ 1000g	5,1 ± 6,9 (movilidad oscilatoria: 37,5 ± 11,9)	Bertuzzi et al. (2018 ^b)
Alpaca	Epidídimo	Swim up	68.8 ± 9.6	Mamani-Mango et al. (2018)
Alpaca	Epidídimo	Centrifugación por 305g	72.9 ± 11.2	Mamani-Mango et al. (2018)

Evaluación de las muestras

Se realizó la evaluación de las siguientes características macroscópicas y microscópicas en el semen fresco y luego de cada tratamiento. El volumen se midió en tubo graduado. La movilidad espermática se observó entre porta y cubreobjetos sobre platina térmica a 37° C utilizando microscopio de contraste de fase. Se evaluó si los espermatozoides tenían movilidad en el lugar (movilidad oscilatoria), movilidad progresiva y movilidad circular. La concentración espermática se determinó en cámara hemocitométrica de Neubauer. La funcionalidad de membrana se evaluó mediante el test de endósmosis (HOS test) el cual se realizó según Giuliano et al. (2008). Brevemente: se incubó a 37° C 50 µl de semen en 200 µl de solución acuosa de fructosa - citrato de sodio (50 mOsmolar) durante 20 minutos. Utilizando un microscopio de contraste de fase, se evaluó el porcentaje de espermatozoides que presentaban endósmosis o "sweling", característico de la funcionalidad de membrana. La integridad de membrana (espermatozoides vivos) se evaluó por medio de la tinción con los fluorocromos diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) y yoduro de propidio (PI). Se efectuó según protocolo adaptado por Giuliano et al. (2008). Brevemente: las muestras de semen (50 µl) se incubaron a 37° C durante 10 minutos en 510 µl de medio de tinción (10 µl de solución stock de CFDA en 500 µl de medio salino). Luego de 10 minutos de incubación se añadió 10 µl de la solución stock de PI y se incubó durante otros 10 min a 37° C. Utilizando un microscopio de epifluorescencia

Leica® modelo DMLS (con filtros 450 – 490 nm para CFDA y 510 – 560 nm para PI) se evaluó la presencia de espermatozoides con membranas íntegras (viables; fluorescencia verde) y con daño de membrana (no viables; fluorescencia roja). La morfología espermática se evaluó mediante los porcentajes de morfología normal y anormal utilizando un microscopio de contraste de fase y colocando una gota entre porta y cubreobjetos. Las anomalías evaluadas fueron cabezas sueltas, anomalías de cola, anomalías de cabeza, gota citoplasmática y anomalías de pieza intermedia.

Disminución de la filancia del plasma seminal

Con el objetivo de disminuir la filancia del plasma seminal, facilitar la manipulación de los eyaculados y promover la movilidad progresiva de los espermatozoides se realizó el protocolo descrito por Giuliano et al. (2010). Brevemente: las muestras fueron incubadas a 37° C durante 8 minutos en una dilución 8:1 con una solución de colagenasa al 0,1% en medio TALP (medio a base de solución de Tyrode, lactato y piruvato) según Parrish et al. (1986) suplementado con 15 mM de Hepes (H-TALP) y 3 mg/ml de albúmina bovina sérica (H-TALP-BSA). Se utilizó Colagenasa Tipo1 (N° C-0130, Clostridium peptidase A from Clostridium histolyticum). Todos los reactivos fueron provistos por Sigma Chemicals (St.1 14 Louis, MO).

Refrigeración de las muestras

Luego de la incubación con la solución de colagenasa al 0,1 %, se dividió el eyaculado en dos alícuotas. La primera alícuota (R) se diluyó 1:2 con un diluyente en base a lactosa 11% (80%) – yema de huevo (20%) (L-Y). En la segunda alícuota (Rc) se realizó una centrifugación a 800g para separar los espermatozoides del plasma seminal y de la solución enzimática. El pellet obtenido se resuspendió en 2 ml de L-Y. Ambas fracciones fueron refrigeradas sometiéndolas a una curva de enfriamiento según Giuliano et al. (2012). Brevemente: las muestras diluidas fueron colocadas en recipientes cuidando que no quede aire en su interior, los recipientes fueron colocados en un vaso de precipitado con 150 ml de agua a 37° C el cual, inmediatamente, fue colocado en una heladera a 5° C. De esta manera se llevó a cabo la curva de enfriamiento en la cual las muestras llegaron a los 5° C a las 2,5 horas. Luego de 24 horas de refrigeración las muestras se estabilizaron durante 15 minutos a 37° C y se realizó el protocolo de evaluación mencionado en materiales y métodos generales.

Selección espermática

Luego de la refrigeración por 24 hs se compararon las siguientes técnicas de selección de espermatozoides en 7 eyaculados de 7 machos: Androcoll-E-Large: una alícuota se sembró suavemente sobre 1 ml del coloide Androcoll-E-Large en tubo cónico, cuidando de no alterar la interfase entre las capas. Luego se centrifugó a 600 x g por 10 minutos y el pellet obtenido se resuspendió en 2 ml de medio H-HAM-BSA. Se centrifugó nuevamente, el pellet se resuspendió en el medio antes mencionado.

Técnica Percoll®: una alícuota de la muestra se sembró suavemente sobre una columna de 1 ml del coloide al (45%), (45%-70%), (45%-80%), (45%-90%) y al (60%-90%) en H-HAM-BSA, cuidando de no alterar la interfase entre las capas. Luego las muestras se centrifugaron a 600 x g por 20 minutos. Luego de la centrifugación, los pellets obtenidos se resuspendieron en 2 ml de medio H-HAM-BSA y se centrifugaron a 600 x g por 10 minutos. Nuevamente, los pellets obtenidos se resuspendieron en el medio antes mencionado.

Técnica swim up: una alícuota se depositó en el fondo de un tubo de centrifugación de 15 ml. Sobre la superficie de la muestra se colocó 2 ml del medio Hepes-HAM- con el agregado de 3 mg/ml de albúmina sérica bovina (H-HAM-BSA). El mismo se deslizó por las paredes del tubo de tal manera de obtener dos fases (inferior, semen; superior, medio enriquecido). Se incubó en estufa durante una hora a 37° C con el tubo colocado en posición inclinada en un ángulo de 45°.

Solamente los gradientes de densidad de Percoll 45%-70% y 45%-80% permitieron obtener una fracción de espermatozoides móviles con una menor cantidad de yema. Consecuentemente se decidió continuar con el experimento utilizando los gradientes de densidad de Percoll 45%-70% y 45%-80%.

De esta manera quedaron conformados 4 grupos, utilizándose para este diseño un total de 14 eyaculados de 7 llamas (n=7, r= 2):

- Refrigerado con plasma seminal (R): columna de Percoll 45/70 (R70) y columna de Percoll 45/80 (R80).
- Refrigerado sin plasma seminal (Rc): columna de Percoll 45/70 (Rc70) y columna de Percoll 45/80 (Rc80).

Análisis estadístico

Para las variables espermáticas en las que se logró normalidad y homogeneidad de varianzas se utilizó un diseño en bloque factorial de un factor y 7 niveles (Factor: tratamiento; niveles: Fresco, R, Rc, R70, R80, Rc70, Rc80), tomándose al macho como bloque. En las variables en las que no se logró normalidad se utilizó el test de Friedman. Los análisis se realizaron mediante el programa InfoStat versión 2011.

RESULTADOS

Con respecto a la selección de espermatozoides refrigerados, cuando se inició el estudio se observó que solamente las muestras que fueron tratadas con Percoll® con los gradientes 45%-70% y 45%-80% permitieron obtener una fracción de espermatozoides móviles con una menor cantidad de yema de huevo. Como las técnicas de producción de embriones in vitro necesitan que los espermatozoides estén limpios de yema de huevo es que se decidió continuar el estudio con esos dos gradientes.

El análisis descriptivo y estadístico diferencial de las características seminales estudiadas en semen fresco, semen refrigerado y luego de cada tratamiento se pueden observar en la Tabla 2.

Efecto de la refrigeración sobre la calidad espermática:

- Movilidad progresiva: fue significativamente superior ($p \leq 0,05$) en los espermatozoides refrigerados sin plasma seminal (Rc) con respecto al semen fresco y al semen refrigerado con plasma seminal (R).
- Movilidad oscilatoria: fue significativamente superior ($p \leq 0,05$) en el semen fresco respecto a las muestras refrigeradas con o sin plasma seminal (R y Rc).
- Movilidad circular: fue significativamente superior ($p \leq 0,05$) en los espermatozoides refrigerados sin plasma seminal (Rc) respecto al semen fresco. No fue diferente entre las muestras refrigeradas.
- Movilidad total: fue significativamente menor ($p \leq 0,05$) en el semen refrigerado con plasma seminal (R) respecto al semen fresco y a los espermatozoides refrigerados sin plasma seminal (Rc). Entre estas últimas no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$).
- Espermatozoides con endósmosis: no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el semen fresco y las muestras refrigeradas con o sin plasma seminal.
- Espermatozoides vivos: no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el semen fresco y los espermatozoides refrigerados con o sin plasma seminal.

Efecto de los gradientes de densidad sobre la calidad espermática en muestras refrigeradas

- Movilidad progresiva: fue mayor en las muestras R70, Rc70 y Rc80 respecto a R80, observándose diferencias significativas entre R80 y Rc70 ($p \leq 0,05$). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras refrigeradas sometidas al gradiente y sus respectivas muestras refrigeradas que no pasaron por el Percoll® (R vs R70 y R80, Rc vs Rc70 y Rc80).
- Movilidad oscilatoria: fue mayor en Rc80 respecto al resto de los gradientes (70, R80 y Rc70), siendo significativa la diferencia entre Rc80 y R70 ($p \leq 0,05$). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras refrigeradas sometidas al gradiente y sus respectivas muestras refrigeradas que no pasaron por el Percoll® (R vs R70 y R80, Rc vs Rc70 y Rc80).
- Movilidad circular: no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los cuatro tratamientos, ni entre las muestras refrigeradas sometidas y no sometidas al pasaje por el gradiente.
- Movilidad total: fue mayor en Rc80 respecto al resto de los gradientes (R70, R80 y Rc70), siendo significativa la diferencia entre Rc80 y las muestras refrigeradas sin PS sometidas al Percoll® (R70 y R80) ($p \leq 0,05$). Además, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras refrigeradas sometidas al gradiente y sus

respectivas muestras refrigeradas que no pasaron por el Percoll® (R vs R70 y R80, Rc vs Rc70 y Rc80).

- Concentración espermática: fue significativamente menor en el tratamiento R80 ($p \leq 0,05$) respecto a los demás tratamientos (R70, Rc70 y Rc80).
- Número total de espermatozoides: en todos los tratamientos se obtuvo un número total de espermatozoides muy inferior al semen fresco. En el tratamiento R80 se observó un número de espermatozoides significativamente menor ($p \leq 0,05$) al resto de los tratamientos.
- Espermatozoides con endósmosis: no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los diferentes gradientes ensayados. Tampoco se observaron diferencias ($p > 0,05$) entre las muestras refrigeradas sometidas al gradiente y sus respectivas muestras refrigeradas que no pasaron por el Percoll® (R vs R70 y R80, Rc vs Rc70 y Rc80).
- Espermatozoides vivos: fue superior en el tratamiento de Rc80 respecto al resto de los gradientes (R70, R80 y Rc70), siendo significativa la diferencia entre Rc80 y R80 ($p \leq 0,05$). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el porcentaje de espermatozoides vivos entre Rc80 y el semen fresco. Los porcentajes obtenidos en los demás tratamientos fueron significativamente ($p \leq 0,05$) menores al observado en el semen fresco.

Tabla 2. Características espermáticas evaluadas en semen fresco y refrigerado de llama con y sin plasma seminal (R y Rc) sometido a diferentes columnas de centrifugación de Percoll® (R70, R80, Rc70 y Rc80). Los valores son expresados en media \pm desvío estándar ($n=7$, $r=2$).

	FRESCO	R	Rc	R70	R80	Rc70	Rc80
Movilidad progresiva (%)	0 ^a	4,1 $\pm 5,6$ ^{ac}	20,9 $\pm 16,2$ ^b	10,5 $\pm 13,1$ ^{bcd}	3,4 $\pm 5,5$ ^{ad}	14,5 $\pm 7,9$ ^b	13,3 $\pm 4,3$ ^{bcd}
Movilidad oscilatoria (%)	32,3 $\pm 20,4$ ^c	4,4 $\pm 5,9$ ^a	6,4 $\pm 4,5$ ^{ab}	3,9 $\pm 4,37$ ^a	11,2 $\pm 18,8$ ^{ab}	10,5 $\pm 15,1$ ^{ab}	21,3 $\pm 19,3$ ^{bc}
Movilidad circular (%)	0 ^a	7,0 $\pm 11,2$ ^{ab}	11,0 $\pm 10,5$ ^b	5,0 $\pm 6,3$ ^{ab}	7,3 $\pm 12,7$ ^{ab}	3,1 $\pm 4,1$ ^{ab}	8,0 $\pm 13,8$ ^{ab}
Movilidad total (%)	32,3 $\pm 20,4$ ^{ac}	15,5 $\pm 19,1$ ^b	38,3 $\pm 21,6$ ^c	19,4 $\pm 20,9$ ^{ab}	21,9 $\pm 22,1$ ^{ab}	28,1 $\pm 13,7$ ^{abc}	42,6 $\pm 23,2$ ^c
Concentración espermática ($\times 10^6$ esperm./ml)	24,3 $\pm 23,2$ ^a	19,8 $\pm 16,9$ ^a	22,7 $\pm 27,3$ ^a	18,7 $\pm 24,3$ ^a	1,9 $\pm 3,7$ ^b	33,8 $\pm 29,5$ ^a	24,8 $\pm 26,2$ ^a
Espermatozoides con endósmosis (%)	36,1 $\pm 13,1$ ^{ab}	50,4 $\pm 18,9$ ^a	35,1 $\pm 10,4$ ^{ab}	36,5 $\pm 19,0$ ^{ab}	45,7 $\pm 25,7$ ^{ab}	27,0 $\pm 14,2$ ^b	37,6 $\pm 18,6$ ^{ab}
Espermatozoides vivos (%)	54,1 $\pm 17,0$ ^{ad}	55,5 $\pm 9,5$ ^{ad}	63,8 $\pm 11,4$ ^a	29,4 $\pm 20,6$ ^{bc}	20,9 $\pm 14,0$ ^b	40,2 $\pm 9,9$ ^c	43,2 $\pm 9,7$ ^{cd}

DISCUSIÓN

Hasta nuestro conocimiento, los diferentes reportes realizados en selección de espermatozoides de CSA se refieren a estudios realizados en espermatozoides de epidídimo (Santa Cruz et al., 2016) o reportes en los cuales se han utilizado diferentes enzimas (colagenasa o papaína) para disminuir la viscosidad del plasma seminal en CSA con resultados variables (Giuliano et al., 2010; Kershaw-Young et al., 2013). Otra metodología para obtener espermatozoides limpios de PS ha sido la centrifugación a alta velocidad (Kershaw-Young y Maxwell, 2011; Fumuso et al., 2018).

El presente estudio es el primero en comparar diferentes técnicas de selección espermática en espermatozoides refrigerados de llama tanto en ausencia como presencia de plasma seminal. Al inicio del estudio se observó que solamente las muestras que fueron tratadas con Percoll® con los gradientes 45% - 70% y 45% - 80% permitieron obtener una fracción de espermatozoides móviles con una menor cantidad de yema de huevo. Como las técnicas de producción de embriones in vitro necesitan que los espermatozoides estén limpios de yema de huevo es que se decidió continuar el estudio con esos dos gradientes y descartar el uso de Androcoll-E-large, swim up y otros gradientes de Percoll® (45%-90% y 60%-90%). Por otra parte, al analizar los

resultados se puede observar que el tratamiento con gradiente de Percoll 45%-80% realizado en las muestras refrigeradas sin plasma seminal fue el que permitió obtener una muestra de espermatozoides con mejor porcentaje de espermatozoides vivos. En las demás variables espermáticas los resultados fueron similares para todos los gradientes utilizados, a excepción de la concentración que fue significativamente inferior en las muestras refrigeradas con plasma y sometidas a la columna 45%-80% (R80). Por otra parte, se puede observar que la tanto la concentración como la viabilidad de las muestras refrigeradas con PS sometidas a los gradientes de Percoll (R70 y R80) fue inferior a las muestras refrigeradas sin PS (Rc 70 y Rc 80). Estos resultados podrían deberse a que la presencia de PS pueda disminuir el número de espermatozoides recuperadas e influir en el pasaje de las muestras por el gradiente y consecuentemente disminuir el porcentaje de espermatozoides vivos.

Por otra parte, los resultados de este estudio mostraron que ambos protocolos de refrigeración tanto en ausencia como en presencia de plasma seminal conservaron la viabilidad espermática y funcionalidad de membrana, sin embargo, la movilidad tanto progresiva como total fue superior en las muestras refrigeradas sin plasma seminal. Estos resultados coinciden con los reportados por Carretero et al., (2017) en semen de llama refrigerado con y sin PS.

CONCLUSIONES

El pasaje de espermatozoides refrigerados de llama en ausencia de plasma seminal sobre columnas de Percoll® 45% - 80% permite obtener espermatozoides móviles, libres de diluyente y conservando la viabilidad y funcionalidad de la membrana plasmática. Además, dicho protocolo permite obtener un número suficiente de espermatozoides para su utilización en protocolos de fertilización asistida.

CONFLICTO DE INTERESES

No hay conflictos de intereses.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Concepción y diseño del estudio (SMG), desarrollo de la metodología (STR), escribe y revisa el artículo (SMG y MIC) y supervisión del estudio (MIC, FF, MB).

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue realizado gracias al subsidio UBACyT (20020120200270BA) de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.

REFERENCIAS

- Berland MA, von Baer A, Ruiz J, Parraguez V, Morales P, Adams GP, Ratto MH. In vitro fertilization and development of cumulus oocyte complexes collected by ultrasound-guided follicular aspiration in superstimulated llamas. *Theriogenology*. 2011; 75: 1482-1488.
- Bertuzzi M, Fumuso F, Arraztoa CC, Carretero MI. El uso de Androcoll-ETM permite separar espermatozoides de semen fresco de llama no tratado enzimáticamente. *InVet Vol*. 2018a; 20,1: 73.
- Bertuzzi M, Fumuso F, Tonus L, Giuliano S, Carretero M. Comparación de dos velocidades de centrifugación para seleccionar espermatozoides de semen fresco de llama utilizando Androcoll-ETM. Presentado en VIII Congreso Mundial de Camélidos. 21 – 23 de noviembre 2018. Oruro, Bolivia. Trabajo completo. Libro de Actas tomo1: 2018b. 43-44.
- Carretero MI, Giuliano SM, Casaretto CI, Gambarotta MC, Neild DM. Evaluation of the effect of cooling and of the addition of collagenase on llama sperm DNA using Toluidine blue. *Andrologia*. 2012; 44: 239-247.
- 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. *Andrologia*. 2015; 47(6): 685-693.
- Carretero MI, Giuliano SM, Arraztoa CC, Santa Cruz RC, Fumuso FG, Neild DM. Comparison of two cooling protocols for llama semen: With and without collagenase and seminal plasma in the medium. *Andrologia*. 2017; 49:e12691. <https://doi.org/10.1111/and.1269>.
- Casaretto C, Martínez Sarrasague M, Giuliano S, Rubin de Celis E, Gambarotta M, Carretero I, Miragaya M. *Andrologia*, Alemania. 2012; 44: 335-341.
- 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. In vitro production of llama embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Anim. Reprod. Sci*. 2008; 109 (1-4):298-308.
- Condori RL, Huanca W, Chileno M, Cainzo J, Valverde F, Becerra JJ, Quintela LA, Herradon PG. Effect of follicle-stimulating hormone addition on in vitro maturation and cleavage of alpaca (*Vicugna pacos*) embryos. *Reproduction, Fertility and Development*. 2010; 23, 224.
- Fumuso FG, Giuliano SM, Chaves MG, Neild DM, Miragaya MH, Gambarotta MC, Carretero MI. Seminal plasma affects the survival rate and motility pattern of raw llama spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 2018; 192: 99-106.
- Del Campo MR, Del Campo CH, Donoso MX, Berland M, Mapletoft RJ. In vitro fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology*. 1994; (41): 1219-1229.
- Director A, Giuliano S, Carretero M, Pinto M, Trasorras V, Miragaya M. 2007. Electroejaculation and seminal characteristics in llama (*Lama glama*). *Journal of Camel Practice and Research*. 14 (2): 203-206.
- Gamarra G, Huaman E, León S, Carpio M, Alvarado E, Vivanco W. Primeros embriones in vitro de alpaca obtenidos por maduración, fertilización y cultivo in vitro provenientes de ovarios de camal. XXXI Reunión científica anual de la Asociación Peruana de Producción animal. Realizado el 15 al 18 de octubre en la Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Zootecnia. 2008.
- Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Animals Reproduction Science*. 2008; 104: 359-369.
- Giuliano S, Carretero M, Gambarotta M, Neild D, Trasorras V, Pinto M, Miragaya M. Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Animal Reproduction Science*. 2010; 118:98-102.

- 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. 2012 *Animal Reproduction Science*. 2012; 131: 204-210.
- Gomez G, Ratto MH, Berland M, Wolter M, Adams GP. Superstimulatory response and oocyte collection in alpacas. *Theriogenology* 2002. 57:584.
- Henkel R, Schill W. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2003; 1: 108.
- 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.
- Huanca W, Condori R, Cainzos J, Chileno M, Quintela L, Becerra J, Herradon PG. 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*. 2009; 22:327.
- Huanca W, Condori RL, Chileno MA, Cainzos J, Becerra JJ, Quintela LA, Herradon PG. In vivo maturation and in vitro fertilization of alpaca oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*. 2010; 23: 204.
- Kershaw-Young CM, Maxwell WMC. The effect of seminal plasma on alpaca sperm function. *Theriogenology*. 2011; 76: 1197-1206.
- Kershaw-Young CM, Stuart C, Evans G, Maxwell W. The effect of glycosaminoglycan enzymes and proteases on the viscosity of alpaca seminal plasma and sperm function. *Anim. Reprod. Sci.* 2013; 138: 261–267
- Mamani-Mango G, Gonzales MM, Hidalgo MR, Mendoza Mallma J, Ruiz Bejar J, Rivas Palma V, Mellisho Salas E. Effect of extender and freezing rate on quality parameters and in vitro fertilization capacity of alpaca spermatozoa recovered from cauda epididymis. *Biopreservation and Biobanking*. 2018:021. Mary Ann Liebert, inc. doi: 10.1089/bio.2018.0021
- Mendoza J, Ayuque A, Triviño F, Ayuque G, Landeo L, Ratto M, Correa J, Ruiz J. 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. 2009.
- Ratto MH, Gomez C, Berland M, Adams GP. Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Animal Reproduction Science*. 2007; 97:246-256.
- Sansinena MJ, Taylor SA, Taylor PJ, Schmidt EE, Denniston RS, Godke RA. In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 2007;99: 342-353.
- Santa Cruz CR, Carretero MI, Arraztoa C, Neild D, Trasorras V, Miragaya M, Giuliano SM. Use of Androcoll-ETM for selecting llama sperm. Preliminary results. *InVet*, 2010; 12: 292.
- Santa Cruz R, Giuliano SM, Gambarotta MC, Morrell JM, Abraham MC, Miragaya MH, Carretero MI. Comparison of different methods of sperm selection of llama raw semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2016;173: 8-12.
- Trasorras V, Giuliano S, Chaves G, Neild D, Agüero A, Carretero MI, Santa Cruz R, Baca Castex C, Alonso A, Pinto M, Morell J, Miragaya M. In vitro embryo production in llamas (*Lama glama*) from in vivo matured oocytes with fresh semen processed with Androcoll-ETM using defined embryo culture media. *Reprod. Dom. Anim.*, 2012; 47: 562–567.
- Trasorras V, Giuliano S, Miragaya M. In vitro production of embryos in South American Camelids. *Anim. Reprod. Sci.*, 2013; 10: 187-93.