



CAPÍTULO IV

RELACIÓN DEL PLASMA SEMINAL CON LOS ESPERMATOZOIDES DE SEMEN FRESCO Y CRIOPRESERVADO DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

María Ignacia Carretero, Fernanda Gabriela Fumuso y
María Susana Giuliano

RESUMEN

El plasma seminal (PS) actúa como un medio de transporte para los espermatozoides a través del tracto reproductivo de la hembra y del macho. Además, regula la osmolaridad del eyaculado a través de los componentes inorgánicos, es fuente de energía para los espermatozoides, brinda protección buffer frente a los cambios de pH, protege a los espermatozoides de los efectos deletéreos de las especies reactivas del oxígeno a través de sus agentes antioxidantes y regula la respuesta inmune del tracto reproductivo de la hembra. Por otra parte, las proteínas del PS han sido asociadas a eventos relacionados con la fertilización como la maduración y capacitación espermática y como posible medio de interacción de los espermatozoides con el oviducto y el ovocito. Similar a otras especies, en los camélidos sudamericanos (CSA) se ha estudiado la composición proteica del PS. Es así que, se determinó que el factor de crecimiento nervioso beta (β -NGF) conforma entre el 15 al 45% de las proteínas totales del PS de la alpaca, llama y camello; y que no sólo estaría implicado en el proceso de ovulación, sino que también, podría tener un rol en la fisiología del espermatozoide de llama y del resto de los CSA. Es por esta razón que, se han realizado estudios que evalúan el efecto del PS sobre espermatozoides de semen fresco y epididimarios de estas especies. Por otra parte, la filancia y elevada viscosidad del PS de los CSA, que no disminuyen con la incubación en el tiempo caracterizan los eyaculados de estas especies, diferenciándolos del resto de las especies productivas y dificultando el desarrollo de biotecnologías reproductivas. En este sentido, en muchas especies, el PS es rutinariamente diluido o removido previo al proceso de criopreservación de semen; esto puede tener efectos positivos o negativos sobre la función espermática y la fertilidad. También, el PS ha sido agregado luego del proceso de criopreservación. Ambas situaciones fueron experimentadas en espermatozoides refrigerados y congelados de llama y se presentan en este capítulo. A pesar de un notable avance en el conocimiento



MARÍA IGNACIA CARRETERO, FERNANDA GABRIELA FUMUSO Y MARÍA SUSANA GIULIANO

de las funciones del PS, todavía existen controversias acerca de las acciones del PS en la función espermática, en la fertilidad del macho y la relación de éste sobre los espermatozoides criopreservados de CSA.



INTRODUCCIÓN

Durante la eyaculación en el tracto reproductivo de la hembra, los espermatozoides son transportados en un fluido biológico, el PS. Se define al PS como una secreción compleja compuesta por iones inorgánicos, azúcares, sales orgánicas, lípidos, enzimas, prostaglandinas, proteínas y varios factores producidos por los testículos, epidídimos y glándulas sexuales accesorias del macho (Maxwell *et al.*, 2007). Inicialmente, se le otorgó al PS un rol de transporte y nutrición; actualmente, debido a su composición, principalmente proteínas y otras moléculas como azúcares y lípidos que se combinan e interaccionan con compuestos de la superficie de los espermatozoides, se ha sugerido que el mismo posee también una función biológica (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011). Por ejemplo, las proteínas del PS han demostrado tener influencia en la maduración espermática (Dacheux y Paquignon, 1980; Dacheux *et al.*, 2005), la estabilización de las membranas (Chang, MC., 1957) y la capacitación espermática (Manjunath y Thérien, 2002), así como, en la interacción con el oviducto (Gwathmey *et al.*, 2006; Zampini *et al.*, 2017) y el ovocito (Töpfer-Petersen *et al.*, 1998). Además, el PS tendría un rol indirecto en la reproducción al activar mecanismos inflamatorios e inmunes en el tracto reproductivo de la hembra (Bromfield J.J., 2014; Schjenken y Robertson, 2014; Rath *et al.*, 2016).

Las proteínas del PS han sido objeto de estudio y se han dividido en tres familias principales: las adhesinas espermáticas (spermadhesins), las proteínas con fibronectina dominios tipos-2 (BSPs: Binder of Sperm Proteins) y las proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISPs: Cysteine Rich Secretory Proteins) (de Graff *et al.*, 2014). La mayor parte de ellas derivan de las glándulas sexuales accesorias (de Graff *et al.*, 2014) y su concentración varía entre especies e incluso entre individuos de una misma especie (Druart *et al.*, 2013). Tanto el carnero como el porcino presentan altas concentraciones de BSPs y adhesinas (de Graff *et al.*, 2014). Mientras que, el PS del toro contiene elevadas cantidades de BSPs, en el equino se detectan altas concentraciones de CRISPs. Por otro lado, la llama, alpaca y camello presentan elevadas concentraciones de un factor de crecimiento nervioso beta (β -NGF), al que se le ha atribuido un rol principalmente ovulatorio (Adams *et al.*, 2005; Druart *et al.*, 2013; de Graff *et al.*, 2014). Pequeñas cantidades de este factor han sido identificadas también en especies de ovulación espontánea como el toro, el carnero y el padrillo equino (de Graff *et al.*, 2014). Queda por



determinar si esta proteína tiene efectos similares en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal en las especies de ovulación espontánea como el establecido en aquellas de ovulación inducida. Otra proteína encontrada en altas concentraciones en el PS de alpacas es la mucina 5B, vinculada a la viscosidad y elevada filancia del semen de esta especie (Kershaw-Young y Maxwell, 2012).

No obstante, los reportes referidos a los efectos del PS en la fisiología espermática son contradictorios, ejerciendo el PS un efecto positivo o negativo en la función de los espermatozoides dependiendo de la especie estudiada. Inclusive, en la misma especie se ha observado variabilidad en el efecto que ejerce el PS sobre la funcionalidad espermática (Maxwell *et al.*, 1999; O' Meara *et al.*, 2007; Leahy *et al.*, 2010). Se ha hipotetizado que esta variabilidad en la función y efecto del PS podría explicarse en parte, por la diferente composición proteica del PS, cuya causa, a su vez, podría deberse a las diferencias en el tamaño y estructuras de las glándulas accesorias, así como en la presencia de las mismas. Es así que, el cerdo presenta glándulas bulbouretrales, próstata y vesiculares grandes en tamaño; mientras que, en el carnero y en el toro las glándulas vesiculares son grandes, pero las bulbouretrales y la próstata son relativamente pequeñas y diseminadas (Maxwell *et al.*, 2007). Los camélidos presentan próstata y glándulas bulbouretrales, estando ausentes las glándulas vesiculares (Bravo W.P., 2014). Por otro lado, la variabilidad en la composición proteica del PS también se ha asociado a los diferentes mecanismos de eyaculación entre las especies. Por ejemplo, los rumiantes depositan un eyaculado de bajo volumen y alta concentración espermática a nivel de la vagina. El equino y el porcino depositan el semen directamente en el útero de la hembra a través de un eyaculado de alto volumen y baja concentración espermática (Druart *et al.*, 2013). Mientras que, los camélidos depositan un eyaculado filante, de bajo volumen y con un número variable de espermatozoides ($10 - 600 \times 10^6$ espermatozoides/ml) a lo largo de todo el tracto reproductivo de la hembra, llegando hasta a la unión útero-tubárica. Por lo tanto, las diferencias en la composición proteica del PS entre las especies podría ser resultado de los diferentes requerimientos que necesita el espermatozoide para interactuar con el tracto reproductivo de la hembra.

En lo que respecta a biotecnologías reproductivas aplicadas en los machos, actualmente, muchos trabajos se enfocan en estudiar el efecto del PS en los protocolos de refrigeración y congelamiento de semen. Sin embargo, todavía existen muchos interrogantes y es posible que, lo que funciona correctamente en una especie o en un individuo no funcione en otra/o. En un protocolo de



criopreservación los espermatozoides y el PS se exponen a un diluyente con el objetivo de minimizar los daños que sufren las células cuando son expuestas a las bajas temperaturas. Sin embargo, al diluir el eyaculado se diluye el efecto del PS y se desconoce si esa dilución podría afectar la funcionalidad del mismo. Por otra parte, durante el servicio natural, los espermatozoides permanecen en contacto con el PS un periodo de tiempo relativamente corto. Por ello, uno de los interrogantes cuando se congelan muestras de semen, es conocer si hay que dejar o retirar el PS; si hay que congelarlo con un cierto porcentaje de PS o si hay que agregarlo luego de descongelar las muestras. También, hay que tener en cuenta que la composición del PS varía entre los individuos de una misma especie y que, esta diferente composición podría generar que un individuo congele o refrigere semen mejor que otro.

Actualmente, existe un especial interés en determinar la composición proteica del PS y se está avanzado en comprender la acción de tales proteínas sobre la funcionalidad de los espermatozoides. El objetivo final es identificar proteínas que puedan ser beneficiosas para la formulación de medios de criopreservación con vistas a mejorar los porcentajes de preñez mediante inseminación artificial.

PLASMA SEMINAL EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Es de amplio conocimiento que el semen de los CSA presenta características particulares, incluyendo un bajo volumen y una concentración espermática variable, que limitan el número de experimentos que se puedan realizar en una mismo eyaculado (Giuliano *et al.*, 2008; Carretero *et al.*, 2015a; Bertuzzi *et al.*, 2020). Además, los espermatozoides de semen fresco presentan movilidad oscilatoria con muy baja o nula movilidad progresiva (Giuliano *et al.*, 2010). Sin embargo, son las características reológicas del PS, como la filancia y la viscosidad estructural elevada (Casaretto *et al.*, 2012) las que más importancia han tenido al definir los eyaculados de CSA. A diferencia del equino y porcino, y similar al humano y mono, en los CSA el componente viscoso del PS se deposita a lo largo de la eyaculación y es distribuido en forma homogénea en la totalidad del eyaculado, mientras que, en el porcino y el equino constituye una fracción del eyaculado, el gel (Kershaw-Young y Maxwell, 2012). Por otra parte, contrario a lo que sucede en el humano (Dunn *et al.*, 1977), la licuefacción del semen de CSA no ocurre luego de la incubación del mismo durante 30 hs a 37 °C o a temperatura ambiente (Apichela *et al.*, 2007) o demora mucho tiempo



(24-48 hs) (Garnica *et al.*, 1993). Debido a que el PS de alpaca posee elevadas cantidades de glicosaminoglicanos (GAGs), inicialmente, se asoció a los mismos con las características reológicas del semen de los CSA, pero las enzimas que degradan los GAGs no fueron efectivas para disminuir completamente la filancia (Kershaw-Young *et al.*, 2013). Mientras que, el uso de enzimas proteolíticas como papaína, proteinasa K, fibrinolisisina, tripsina y colagenasa fueron efectivas, permitiendo eliminar dicha característica (Bravo *et al.*, 2000; Giuliano *et al.*, 2010; Kershaw-Young *et al.*, 2017). Estos resultados sugieren que serían las proteínas y no los GAGs las responsables de la filancia del PS de los CSA (Kershaw-Young *et al.*, 2017). Dentro de ellas, la mucina 5B es definida como una proteína formadora de gel y sería aportada por las glándulas bulbouretrales durante la eyaculación (Apichela *et al.*, 2014). Esta proteína es 5 veces más elevada en muestras con alta filancia respecto a muestras de baja filancia (Kershaw-Young y Maxwell, 2012). Apoyando esta hipótesis, Apichela *et al.* (2014) observaron que los eyaculados provenientes de un macho al cual se le habían extirpado las bulbouretrales carecían de filancia. Por otra parte, es interesante remarcar que, Casaretto *et al.* (2012) determinaron que la filancia y la viscosidad estructural son características reológicas diferentes del PS de la llama. Estos autores no encontraron relación entre la formación de hilo (filancia) y la viscosidad estructural medida objetivamente mediante un viscosímetro; es decir, algunas de las muestras que presentaban elevada viscosidad estructural no formaban hilo al ser manipuladas. Adicionalmente, no observaron diferencias significativas en la viscosidad estructural entre muestras tratadas y no tratadas con colagenasa, sin embargo, las muestras tratadas con la enzima no presentan filancia, mientras que la misma se conservaba en las muestras no tratadas (Casaretto *et al.*, 2012). Estos resultados confirman que la viscosidad estructural y la filancia son características reológicas diferentes del PS de los CSA.

Con respecto al manejo del semen, estas características reológicas dificultan el manejo de los eyaculados y, consecuentemente, el desarrollo de protocolos de criopreservación de semen así como, de otras técnicas de reproducción asistida. Es de conocimiento que la filancia y viscosidad de los eyaculados de CSA impiden la correcta separación de los espermatozoides del PS, la dilución y homogeneización de las muestras con los diluyentes y crioprotectores, la separación en alícuotas y el envasado en las pajuelas (Carretero *et al.*, 2015a; Fumuso *et al.*, 2019). Además, algunas técnicas de evaluación de semen como la citometría de flujo no pueden utilizarse en los CSA debido a la presencia del PS. Por todas estas razones se han utilizado la centrifugación a elevada velocidad (13.400 rpm) o la incubación del semen con diferentes enzimas para



separar los espermatozoides del PS y mejorar la manipulación de las muestras, respectivamente (Bravo *et al.*, 2000; Giuliano *et al.*, 2010; Kershaw-Young y Maxwell, 2011; Morton *et al.*, 2012; Kershaw-Young *et al.*, 2013; Carretero *et al.*, 2015a; Kershaw *et al.*, 2017; Fumuso *et al.*, 2018a). Las centrifugaciones a elevada velocidad se han utilizado con el objetivo de obtener muestras de PS que posteriormente se adicionaron a espermatozoides para estudiar su efecto sobre la fisiología espermática, es decir, los espermatozoides resultantes de esas centrifugaciones no se han empleado en los diferentes experimentos, dado que, podrían estar dañados (Kershaw-Young y Maxwell, 2011; Fumuso *et al.*, 2018a)

La tripsina, fibrinolisisina y proteinasa K permitieron disminuir la filancia de los eyaculados de llama y alpaca, pero con todas se observaron efectos perjudiciales en la función espermática (Bravo *et al.*, 2000; Kershaw-Young *et al.*, 2013). Algunos estudios han reportado efectos deletéreos respecto al uso colagenasa (Morton *et al.*, 2008). Mientras que, en nuestro laboratorio la incubación de semen de llama con una solución de colagenasa (1 mg/ml) en HEPES-TALP demostró ser eficaz para eliminarla filancia de las muestras, separar los espermatozoides del PS e inducir movilidad espermática progresiva (Conde *et al.*, 2008; Giuliano *et al.*, 2010) y así, conseguir la primera preñez a nivel mundial en CSA a partir de embriones obtenidos mediante fertilización *in vitro* (Trasorras *et al.*, 2014). La diferencia entre estudios podría deberse a la concentración final de enzima utilizada, si bien Morton *et al.*, utilizaron concentraciones iniciales similares a las nuestras (1 mg/ml), la concentración final de enzima fue superior dado que utilizaron diluciones 1:1, mientras que en nuestro caso la dilución fue 1:4 (enzima:semen). La papaína, enzima presente en la papaya ha permitido reducir la fiancia en muestras de semen de alpaca, sin embargo, se observó daño a nivel del acrosoma espermático cuando las muestras fueron expuestas durante 10 min a 1 hora en concentraciones de 0,5 a 4 mg/ml (Morton *et al.*, 2008). Contrariamente, Kershaw-Young *et al.* (2013) observaron que la papaína fue efectiva para reducir la filancia del semen de alpacas sin afectar la movilidad, viabilidad, acrosoma y el ADN de los espermatozoides, cuando la utilizaron a una concentración de 0,1 mg/ml, menor a la empleada por Morton *et al.* (2008). Por lo que, estos autores sugieren que la incubación con papaína podría ser utilizada previo al proceso de criopreservación para facilitar el manejo del semen. 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 permitir obtener un adecuado pellet espermático para su criopreservación (Bertuzzi *et al.*, 2020). Interesantemente, las muestras que fueron



procesadas por dicho coloide no formaron hilo luego de resuspender el pellet obtenido en medio HEPES- Ham, sin embargo los espermatozoides conservaron la movilidad oscilatoria. Estos resultados indicarían que el patrón de movilidad de los espermatozoides de llama no estaría relacionado a la formación de hilo confirmando lo observado en un estudio previo (Fumuso *et al.*, 2018a). A su vez, estos resultados sugieren que con este procedimiento a pesar de remover el PS y perder la filancia, algunos componentes del PS podrían permanecer adheridos a la membrana espermática generando un efecto mecánico microscópico y/o una interacción molecular que impediría que los espermatozoides adquieran movilidad progresiva (Bertuzzi *et al.*, 2020).

Similar a otras especies, en los CSA se han realizado estudios para determinar la composición proteica del PS (Druart *et al.*, 2013; Sari *et al.*, 2018). Dichos trabajos determinaron que el β -NGF conforma alrededor del 15 al 45% de las proteínas totales del PS de la llama, alpaca y camello (Tanco *et al.*, 2011; Druart *et al.*, 2013; Fatnassi *et al.*, 2017). Dicho factor presente en el PS no solo estaría implicado en el proceso de ovulación de las hembras de camélidos, sino que también, podría jugar un rol sobre el espermatozoide de llama y del resto de los CSA. Sari *et al.* (2018) confirmaron mediante inmunohistoquímica la presencia del receptor del factor β -NGF (TrKA) tanto en espermatozoides epididimarios como en espermatozoides provenientes de eyaculados de llama. Sin embargo, sólo observaron presencia del β -NGF unido a la pieza media en los espermatozoides del eyaculado estando ausente en los epididimarios, indicando que dicho factor es aportado por el PS durante la eyaculación y que la próstata sería el principal sitio de producción del mismo en estas especies (Bogle *et al.*, 2018; Sari *et al.*, 2018). Además, la presencia de receptores TrKA en la pieza media, sitio de localización de las mitocondrias, podría sugerir la participación del β -NGF en el patrón de movilidad oscilatorio característico del espermatozoide de eyaculado de llama (Sari *et al.*, 2018) y posiblemente del resto los camélidos. Por otro lado, Zampini *et al.* (2017) determinaron que la proteína SL15 perteneciente a la familia de las lecitinas se encuentra en el PS de la llama y podría ser la responsable de la formación del reservorio espermático al unirse a la N- acetilgalactosamina presente en el epitelio oviductal (Apichela *et al.*, 2014). Estos autores, sirvieron hembras de llama con machos con y sin glándulas bulbouretrales observando que a las 24 hs del servicio los espermatozoides permanecían adheridos al epitelio de la unión útero tubárica sólo en hembras servidas con el macho con bulbouretrales. Mientras que, no se observaron espermatozoides adheridos a la mucosa oviductal en las hembras servidas con el macho que no tenía bulbouretrales (Apichela *et al.*, 2014). Estos resultados indican que el PS y



en particular las secreciones de las glándulas bulbouretrales participan en la formación del reservorio espermático en la llama. Teniendo en cuenta que son especies de ovulación inducida y que, en promedio la alpaca ovula a las 26 hs y la llama a las 30 hs post-servicio (San-Martin *et al.*, 1968; Ratto *et al.*, 2006), la formación de un reservorio en el tracto reproductivo de la hembra que permita mantener a los espermatozoides viables a la espera del ovocito, resulta crítico en estas especies.

EFECTO DEL PLASMA SEMINAL SOBRE ESPERMATOZOIDEOS DE SEMENFRESCO DE CSA

Dada la importancia del PS en los CSA se han realizado algunos estudios que evalúan el efecto del mismo sobre espermatozoides epididimarios o de semen fresco en estas especies. Un trabajo realizado en alpacas reporta que una concentración final de 10% de PS conserva la movilidad espermática, la integridad acrosómica y la viabilidad de espermatozoides de epidídimo y de semen fresco durante 3 horas de incubación a 37 °C (Kershaw-Young y Maxwell, 2011). Un estudio realizado en nuestro laboratorio en semen fresco de llama obtenido mediante electroeyaculación (**Figura 1**), evidenció que el PS está involucrado en el patrón de movilidad de los espermatozoides. En dicho trabajo observamos que cuando se resuspendió el pellet de espermatozoides con PS, luego de haber adquirido un patrón progresivo de movilidad a partir de una incubación enzimática, los mismos retomaban el patrón de movilidad oscilatoria (MO) característico del semen fresco. En cambio, si se utiliza un medio diferente al PS, como el HEPES-TALP (HT) para resuspender el pellet, la movilidad espermática era mayormente progresiva y con mayor vigor. A su vez se observó un descenso significativo de la movilidad total (MT) a las 3 hs de incubación en las muestras con PS, mientras que se conservó en las muestras resuspendidas en HT (Carretero *et al.*, 2015b). Con el objetivo de evaluar otros porcentajes de PS, realizamos un estudio utilizando 0, 10, 50 y 100% de PS en HT e incubando las muestras a 37 °C durante 3 hs (Fumuso *et al.*, 2018a). Similar al experimento anterior, las muestras con bajos porcentajes de PS (0 y 10%) presentaron mayores porcentajes de movilidad progresiva (MP). Las muestras incubadas con 100% de PS presentaron sólo MO mientras que, las incubadas con 50% de PS presentaron ambos tipos de movilidad (MO y MP). Por otra parte, la MT de las muestras con 0, 10 y 50% de PS se conservó a lo largo de las 3 hs de incubación mientras que, similar al estudio previo, se observó un descenso significativo de la misma en las muestras con 100% PS. Estos resultados



permitieron validar el trabajo anterior y demostraron que, según el porcentaje de PS agregado a los espermatozoides de semen fresco de llama, varía el patrón de movilidad que predomina en las muestras. Es así como, las muestras incubadas con mayores porcentajes de PS presentaron mayores porcentajes de espermatozoides con MO. Mientras que, las muestras con menores porcentajes de PS presentaron mayores porcentajes de espermatozoides con MP. El patrón de MO característico de los espermatozoides de CSA ha sido atribuido a las características reológicas particulares del semen de estas especies. Es así que, se ha propuesto que el PS ejercería un efecto mecánico sobre los espermatozoides impidiendo que se desplacen en forma progresiva y sólo oscilen en el lugar (Lichtenwalner *et al.*, 1996; Von Baer y Helleman 1998; Bravo *et al.*, 1999; Brown B.W., 2000). Sin embargo, podrían existir interacciones más complejas entre los espermatozoides de estas especies y el PS, donde diversos componentes del mismo podrían actuar a nivel molecular sobre la membrana y/o incluso tener una acción bloqueando la movilidad de los espermatozoides. Reforzando dichas hipótesis, se ha observado que la simple dilución de los eyaculados de llama no induce a los espermatozoides a adquirir MP (Giuliano *et al.*, 2010). A su vez, se observó que el uso de medios de criopreservación con yema de huevo, permiten que los espermatozoides de llama adquieran MP, aún cuando las muestras diluidas conservan las características reológicas propias de los eyaculados de los CSA como la filancia (Bravo y col., 1996; Giuliano S.M., observación personal; Fumuso *et al.*, 2019). Como se mencionó previamente, al separar espermatozoides de semen fresco de llama no tratado enzimáticamente del PS mediante el pasaje a través de Androcoll-ETM, observamos que los espermatozoides conservaron la MO (Bertuzzi *et al.*, 2020). Pensamos que, a pesar de remover el PS mediante el coloide y, consecuentemente, perder la filancia; algunos componentes del PS podrían permanecer adheridos a la membrana espermática generando un efecto mecánico microscópico y/o una interacción molecular que impediría que los espermatozoides adquieran movilidad progresiva (Bertuzzi *et al.*, 2020). Todas estas observaciones (Bravo *et al.*, 1996; Giuliano S.M, observación personal; Bertuzzi *et al.*, 2020) se respaldan con los resultados de Fumuso *et al.* (2018a), quienes observaron MO en muestras con ausencia de filancia (50% de PS a las 3 hs) e incluso también se observaron espermatozoides con un patrón de movilidad oscilatorio en muestras sin PS (0% de PS a las 0, 1,5 y 3 hs), reforzando una hipótesis de tipo molecular más que mecánica para la acción del PS sobre la movilidad de los espermatozoides de llama. Por otra parte, Fumuso *et al.* (2018a) observaron que los espermatozoides incubados con 0, 10 y 50% de PS conservaron la funcionalidad de la membrana y la viabilidad a lo largo de la



incubación, mientras que, se observaron un descenso de ambas características a las 3 hs de incubación en las muestras con 100% de PS.

Además, a las 3 hs de incubación, las muestras que presentaron el mayor porcentaje de espermatozoides vivos con sus acrosomas intactos fueron las incubadas con 50%PS, aunque esta diferencia no fue significativa. Es interesante remarcar también que, en todos los tiempos de incubación, las muestras con bajas concentraciones de PS (0 y 10%) tuvieron un mayor porcentaje de espermatozoides vivos con acrosomas reaccionados respecto a las muestras con altas concentraciones de PS (Fumuso *et al.*, 2018a). Estos resultados indicarían que la ausencia de PS o su presencia en bajo porcentaje en presencia de HT, sería beneficioso para que los espermatozoides reaccionen, conserven su viabilidad y se puedan utilizar en un protocolo de fertilización *in vitro* (FIV). La obtención de embriones de llama por FIV, prescindiendo de la utilización de agentes capacitantes y utilizando espermatozoides de semen fresco en ausencia de PS refuerzan esta hipótesis (Conde *et al.*, 2008; Trasorras *et al.*, 2012; 2014). Además, los mayores porcentajes de espermatozoides con acrosomas reaccionados se observaron en las muestras sin PS (0%), tanto en las muestras evaluadas con FITC-PNA/PI (Fluorescein Isothiocyanate-*Arachis hypogea* agglutinin/Propidium Iodide) como en aquellas teñidas con Coomassie Blue (**Figura 2**). Estos resultados, indicarían que sería necesario agregar un cierto porcentaje de PS para evitar la reacción acrosomal espontánea (Fumuso *et al.*, 2018a). Reforzando esta hipótesis, en porcinos se observó que la adición de 10% de PS a los medios de fertilización *in vitro* evitó la penetración espermática en los ovocitos, sugiriendo que esta inhibición podría ser causada por los factores decapacitantes del PS (Suzuki *et al.*, 2002). A su vez, Kershaw-Young y Maxwell (2011) observaron menores porcentajes de acrosomas intactos en espermatozoides epididimarios de alpaca incubados sin PS (0%) respecto a las muestras incubadas con 10 y 100%. Estos estudios y el nuestro, donde las muestras con mayores porcentajes de PS presentaron mayores porcentajes de espermatozoides con acrosomas intactos, refuerzan la idea de que factores presentes en el PS podrían inhibir reversiblemente el proceso de capacitación y que la ausencia de tales factores podrían llevar a una capacitación espontánea y consecuente reacción acrosomal.

En otro estudio, evaluamos el efecto de diferentes porcentajes de PS (0, 10 y 50%) sobre espermatozoides de semen fresco de llama diluidos en lactosa - yema de huevo (LY) a tiempo 0 hs (Carretero *et al.*, 2016). Esto se realizó con el objetivo de determinar si el efecto del PS en LY era similar al que se observó cuando diluimos los espermatozoides con PS en HT. A pesar de presentar diferentes



porcentajes de PS, en todas las muestras se observó un patrón progresivo de movilidad, siendo prácticamente nula la movilidad oscilatoria. Como se mencionó previamente, la yema de huevo induciría un cambio en el patrón de movilidad de los espermatozoides de llama, pudiendo el predominio de MP en todas las muestras aún en aquellas con 50% de PS, deberse a la yema de huevo del medio de dilución. Por otra parte, a diferencia de lo que observamos en las muestras diluidas en HT, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosomas intactos entre las diferentes concentraciones de PS evaluadas (0, 10 y 50%). Esta diferencia en los resultados entre las muestras diluidas en HT y las diluidas en LY, podrían deberse a que la yema de huevo podría interactuar con factores capacitantes del PS y de esta manera, impedir la capacitación y reacción acrosomal.

A partir de los resultados observados en nuestros estudios respecto al efecto del plasma seminal en los espermatozoides de semen fresco de llama podemos concluir que:

- El patrón de movilidad del espermatozoide de semen fresco de llama está influenciado por el plasma seminal y por la proporción en que éste se encuentra presente en el medio.
- La presencia de movilidad oscilatoria en muestras sin filancia, como las procesadas por Androcoll-ETM y diluidas en HEPES-ham, indicarían que el efecto que ejerce el PS sobre la movilidad de los espermatozoides se produciría mediante una acción de tipo molecular más que mecánica.
- La presencia de yema de huevo en el medio de dilución induciría a los espermatozoides de llama a moverse progresivamente aún en muestras con 50% de PS.
- Sería necesario agregar a los medios un cierto porcentaje de plasma seminal que ejerza un rol decapacitante para evitar la reacción acrosomal espontánea en los espermatozoides de semen fresco de llama.
- El uso de 100% de plasma seminal no es capaz de mantener a los espermatozoides de semen fresco de llama móviles, viables y con sus membranas funcionales durante 3 hs. Determinando que es necesario incorporar un medio de sostén a los espermatozoides además del plasma seminal para mantener a los mismos viables y funcionales en el tiempo.
- La yema de huevo presente en el medio de dilución podría prevenir la capacitación espermática y consecuente reacción acrosomal en los espermatozoides de semen fresco de llama.



Figura 1. Maniobra de extracción de semen de llama bajo anestesia general, vástago de estimulación y equipo de electroeyaculación (Director *et al.*, 2007).

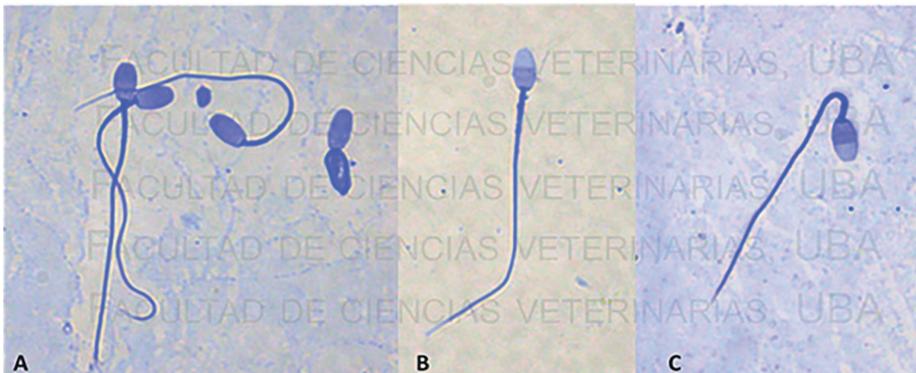


Figura 2. Espermatozoides de llama teñidos con la tinción de Azul de Coomassie (Coomassie Blue) utilizada para evaluar el acrosoma mediante microscopía óptica (1000X). **A:** espermatozoides con acrosomas presentes (teñidos), **B** y **C:** espermatozoides sin acrosomas (no teñidos).

EFEECTO DEL PLASMA SEMINAL EN ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE CSA

En muchas especies, el PS es rutinariamente diluido o removido durante el proceso de criopreservación de los espermatozoides; esto puede tener efectos positivos o negativos sobre la función espermática y la fertilidad (Maxwell *et al.*, 2007). También, el PS ha sido agregado luego del proceso de criopreservación con el fin de preservar la sobrevivencia espermática en el tiempo (Nöthling *et al.*,



2005; O' Meara *et al.*, 2007; Sabatini *et al.*, 2014). En los CSA, la mayoría de los protocolos de criopreservación de semen utilizados no remueven el PS durante el procesamiento de las muestras, es decir el diluyente es agregado al eyaculado completo (Bravo *et al.*, 1996; Aller *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2003; Santiani *et al.*, 2013; Giuliano y col., 2012; Carretero *et al.*, 2015a, Stuart *et al.*, 2019). Sin embargo, como se mencionó previamente, las características reológicas del semen de los CSA dificultan la homogenización de las muestras con los diluyentes, es por esto que, muchos de los estudios mencionados utilizaron enzimas proteolíticas como la colagenasa y la papaína que facilitan la manipulación de las muestras de semen a criopreservar (Carretero *et al.*, 2015a; Stuart *et al.*, 2019).

Los primeros estudios en los que evaluamos el efecto del PS en la criopreservación de semen de llama se realizaron en el 2017 y tuvieron como objetivo evaluar el efecto del PS y de una solución de colagenasa sobre espermatozoides refrigerados y congelados de llama (Carretero *et al.*, 2017a, 2017b). Los protocolos de conservación de las muestras fueron: en presencia de PS y colagenasa (protocolo A) y en ausencia de PS y colagenasa (protocolo B). Con respecto a la refrigeración, ambos protocolos preservaron la viabilidad y funcionalidad de membranas. El protocolo A mostró menor movilidad (total y progresiva) y el protocolo B mayor porcentaje de espermatozoides con cromatina descondensada (Carretero *et al.*, 2017a). Estos resultados muestran que la refrigeración de semen de llama utilizando el protocolo A resulta ser más sencilla para trabajar a campo, ya que no requiere centrifugar las muestras para eliminar el PS. Sin embargo, sería necesario probar ambos protocolos mediante inseminación artificial (IA) para determinar tasas de preñez. Con respecto al congelamiento profundo, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas (movilidad, viabilidad y estado acrosomal) entre el protocolo A y el B. Zea *et al.* (2015) tampoco observaron diferencias significativas en la movilidad, viabilidad y funcionalidad de membranas en espermatozoides de alpaca obtenidos por desviación de conducto deferente y criopreservados en presencia y ausencia de PS. De forma similar, Jiménez *et al.* (2016) no observaron diferencias significativas en la movilidad, viabilidad y potencial de membrana en espermatozoides de epidídimo de alpaca congelados con diferentes concentraciones de PS (0, 5, 10 y 15%). Sin embargo, a diferencia de la refrigeración, en las muestras congeladas observamos un descenso significativo de todas las variables espermáticas evaluadas con respecto al semen fresco (Carretero *et al.*, 2017b).

La criopreservación de semen produce cambios irreversibles en los espermatozoides como: pérdida de la integridad de la membrana (Rasul *et*



al., 2001), daños en el acrosoma (Jones y Stewart, 1979), alteraciones del ADN (Linfor y Meyers, 2002; Carretero *et al.*, 2015a) y modificaciones del citoesqueleto (Holt y North, 1991). Se ha postulado que los factores “decapitantes” del PS se unirían a la superficie espermática retardando o previniendo la capacitación espermática (Maxwell *et al.*, 2007). Como mencionamos previamente, sería necesario agregar un cierto porcentaje de PS al medio para evitar la reacción acrosomal espontánea en espermatozoides de semen fresco de llama. A partir de estos resultados, nos resultó interesante evaluar si lo mismo sucede en los espermatozoides congelados- descongelados de llama. Para corroborar esto se diseñaron dos experimentos en los cuales se evaluó el efecto del agregado de diferentes porcentajes de PS (0, 10 y 50%) previo a la criopreservación (Fumuso *et al.*, 2019) y al descongelamiento de las muestras (Fumuso *et al.*, 2020).

En lo que respecta al agregado de PS previo al proceso de criopreservación, similar a estudios previos, observamos una disminución significativa en la movilidad espermática, funcionalidad de membrana y en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosomas intactos en las muestras congeladas con 0, 10 y 50% de PS con respecto al semen fresco. También observamos un aumento en el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosomas reaccionados en las muestras descongeladas indicando que, el protocolo de congelamiento-descongelamiento utilizado induce cambios similares a la capacitación, fenómeno llamado “criocapitación” como se ha observado en la criopreservación de espermatozoides de otras especies (ovino: Pérez *et al.*, 1996; porcino: Maxwell y Johnson, 1997; bovino: Cormier *et al.*, 1997 y equino: Neild *et al.*, 2003). Previo al congelamiento, no se observó formación de hilo (filancia) en las muestras sin PS, mientras que, se observó filancia en dos de las muestras diluidas con 10% de PS y en siete de las muestras con 50% de PS. A pesar de presentar filancia, sólo en cuatro muestras diluidas con 50% de PS se observó MO (rango: 5 - 40%). Como se mencionó previamente, atribuimos este comportamiento a la presencia de yema de huevo en el diluyente de criopreservación que induciría a los espermatozoides de llama a moverse progresivamente. Además, la yema de huevo podría unirse a las membranas de los espermatozoides y así interferir con el efecto del PS. Esto último se refuerza con el hecho de que no observamos diferencias significativas en la MP entre las muestras diluidas con los diferentes porcentajes de PS (0, 10 y 50%).

Al comparar las características de las muestras descongeladas, se observó formación de hielo en una de las muestras que había sido congelada con 10% de PS y en siete de las muestras que se congelaron con 50% de PS. Por otra parte,



se observaron mayores porcentajes de espermatozoides con MP y MT en las muestras congeladas con 0 y 10% de PS respecto a las congeladas con 50% de PS. Sin embargo, no observamos diferencias en la funcionalidad de membrana, viabilidad, estado acrosomal y el ADN entre las muestras descongeladas (**Figura 3**) (Fumuso *et al.*, 2019).

Respecto al efecto del agregado de PS a las muestras luego del descongelamiento, en este estudio los eyaculados fueron incubados con colagenasa, se centrifugaron y el pellet obtenido se resuspendió en un diluyente para su congelamiento. Luego, las muestras se descongelaron y se agregaron diferentes porcentajes de PS: 0, 10 y 50% y se incubaron a 37 °C durante 3 hs, realizando evaluaciones a las 0; 1,5 y 3 hs. La incubación (37 °C) y la evaluación de los espermatozoides en el tiempo (3 hs) se realizó con el objetivo de acercarnos a las condiciones biológicas que experimenta el espermatozoide en el tracto reproductivo de la hembra luego de la IA. Similar al estudio anterior, observamos una disminución significativa en la movilidad espermática, funcionalidad de membrana y en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosomas intactos en las muestras congeladas-descongeladas con respecto al semen fresco. A diferencia del estudio anterior, ninguna de las muestras descongeladas (0, 10 y 50% de PS) presentó filancia en ninguno de los tiempos de evaluación (0; 1,5 y 3 hs). Sólo se observó MO en las muestras con 50% de PS a las 3 hs de incubación, aunque la misma fue prácticamente nula ($0,2 \pm 1,8\%$). Este resultado fue inesperado, dado que esperábamos observar mayor porcentaje de espermatozoides con MO en las muestras con el agregado de 50% de PS. Se ha reportado en algunas especies que la criopreservación modifica la membrana plasmática de los espermatozoides a nivel estructural, alterando ambos la fluidez y la composición bioquímica, y muchos de esos cambios podrían ser irreversibles (Bailey *et al.*, 2000; Watson, P.F., 2000). Estos cambios podrían afectar sitios de acción del PS en la membrana y esto podría parcialmente explicar la falta de MO observada en las muestras con mayores porcentajes de PS. Una de las proteínas que podría estar relacionada con el patrón de movilidad es el β -NGF presente en altas concentraciones en el PS de camélidos (Druart *et al.*, 2013). Castellini *et al.* (2019) reportaron que el espermatozoide de conejo posee dos receptores de β -NGF (TrKA y p75NTR), y que ambos se relacionan con la movilidad espermática. Como se mencionó previamente, aunque observamos una influencia del PS en el patrón de movilidad del espermatozoide de semen fresco de llama (Carretero *et al.*, 2015b; Fumuso *et al.*, 2018a), aún no se ha explorado el efecto del β -NGF en los patrones de movilidad de los camélidos. Sin embargo, la presencia de uno de los receptores en la pieza media del espermatozoide de llama (Sari *et al.*, 2018) sugiere una



posible implicancia del factor en el patrón de movilidad de los espermatozoides de CSA. En este sentido, la criopreservación podría modificar el receptor del β -NGF en la membrana espermática modificando el patrón de movilidad, esta hipótesis necesita ser estudiada. Otra explicación para la casi nula MO, podría ser la yema de huevo en el diluyente que como mencionamos no sólo induciría a los espermatozoides de llama a adquirir un patrón progresivo de movilidad, sino que además podría interferir con los factores del PS (Fumuso *et al.*, 2019). También, observamos una disminución en el porcentaje de espermatozoides con membranas funcionales en las diferentes muestras (0, 10 y 50 % de PS) a lo largo del tiempo. No se observaron diferencias en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosomas intactos entre las diferentes muestras en los tiempos evaluados, sin embargo, se observó un aumento en el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosomas reaccionados a las 3 hs de incubación respecto a la hora 0. Se ha reportado que proteínas del PS pueden prevenir la capacitación al unirse al espermatozoide y estabilizar las membranas (Maxwell *et al.*, 2007; Muiño-Blanco *et al.*, 2008). Como ya mencionamos, el congelamiento-descongelamiento de las muestras producen cambios en la membranas de los espermatozoides y estos cambios pueden predisponer a que las células reaccionen espontáneamente, un fenómeno llamado “criocapitación” observado en diferentes especies e incluso en la llama (Fumuso *et al.*, 2019). Cambios observados en la membrana de espermatozoides de conejo que fueron inducidos a sufrir la reacción acrosomal (Castellini *et al.*, 2019), refuerzan la hipótesis de que la criopreservación podría modificar sitios específicos de acción de los factores decapacitantes del PS. Estos autores observaron una disminución en aproximadamente un 50% de las células positivas al TrKA en las muestras inducidas respecto a las no inducidas. Nuevamente, el PS no podría ejercer su rol protector en los espermatozoides congelados-descongelados de llama debido a modificaciones en los receptores de la membrana a consecuencia de la criopreservación.

A partir de los resultados observados en nuestros estudios respecto al efecto del plasma seminal en espermatozoides criopreservados de llama podemos concluir que:

- Ambos protocolos de refrigeración utilizados, tanto en presencia como ausencia de plasma seminal y colagenasa, conservaron la viabilidad y funcionalidad de membrana de los espermatozoides de llama.
- La adición de PS (10 y 50%) previo al proceso de criopreservación de espermatozoides de llama, con el diluyente base utilizado y la curva de

congelamiento profunda empleada, no tendría un efecto protector frente al daño por congelamiento.

- La adición post-descongelación de 10% y 50% de plasma seminal fue incapaz de preservar la movilidad espermática o mejorar la supervivencia de los espermatozoides congelados-descongelados de llama.
- Se observó formación de hilo en muestras que no tenían movilidad oscilatoria, reforzando la idea que la filancia y el patrón de movilidad son características independientes en el semen de los CSA.
- Los diluyentes que contienen yema de huevo inducen a los espermatozoides congelados-descongelados de llama a moverse progresivamente, aún en muestras que presentan filancia.
- Los protocolos de criopreservación utilizados generarían un estado de “criocapacitación” en los espermatozoides de llama y consecuentemente los acrosomas reaccionarían espontáneamente.
- Los protocolos de criopreservación utilizados podrían modificar sitios de la membrana espermática impidiendo que el PS cumpla su función.

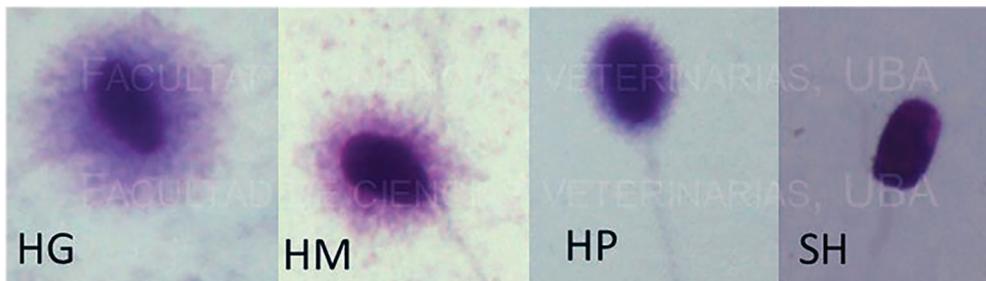


Figura 3. Espermatozoides de llama evaluados con la técnica del halo o de dispersión de la cromatina espermática (SCD: Sperm Chromatin Dispersion): **HG)** Espermatozoide con halo grande, **HM)** Espermatozoide con halo mediano, **HP)** Espermatozoide con halo pequeño y **SH)** Espermatozoide sin halo (1000x). Las categorías HG y HM corresponden a espermatozoides con ADN intacto, mientras que HP y SH corresponden a espermatozoides con ADN fragmentado.

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN CONGELADO

En los CSA, el uso de la IA con semen criopreservado es una biotecnología escasamente utilizada debido a los bajos índices de preñez que se obtienen con la misma, limitando su aplicación a campo. A su vez, existen pocos reportes que, además de las pruebas de diagnóstico *in vitro* realicen pruebas biológicas con semen congelado.

Debido a que ninguno de los protocolos de criopreservación que utilizamos mostró superioridad sobre el otro al evaluar el efecto del PS sobre las características espermáticas *in vitro* (Fumuso *et al.*, 2019; 2020) se decidió inseminar con el protocolo más sencillo (0% de PS). Para ello se utilizó un diluyente a base de lactosa-yema de huevo con 7% de dimetilformamida y un protocolo de congelamiento profundo que incluye un descenso rápido de la temperatura (**Figura 4**). Se utilizó Receptal[®] (Buserelina) para inducir la ovulación de las hembras que presentaron un folículo ≥ 7 mm en fase de crecimiento. Realizamos la IA una vez confirmada la ovulación mediante ultrasonografía debido a que, previamente se observó preñez con semen refrigerado de llama sólo en aquellas hembras en las que se había inseminado una vez confirmada la ovulación (Giuliano *et al.*, 2012). La dosis inseminante se depositó en la cercanía de la papila uterina en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con el folículo ovulatorio. Por esta razón y porque la IA se realizó sobreovulación se decidió no incorporar PS durante la IA, dado que no sería necesaria la formación de un reservorio espermático oviductal. Los porcentajes de preñez utilizando dicha metodología fueron del 0%, siendo el intervalo desde la inducción hasta la detección de la ovulación de $28,8 \pm 1,0$ hs (Fumuso *et al.*, 2018b). Vaughan *et al.* (2003) tampoco observaron preñez al inseminar alpacas con semen congelado utilizando dos diluyentes comerciales (Green/clear camel buffer[®] y Biladyl A&B[®]), ambos con glicerol al 7 %. Estos autores realizaron la IA a tiempo fijo 24 a 30 hs posteriores a la inducción de la ovulación con buserelina, confirmando la misma en la totalidad de las hembras por la presencia del cuerpo lúteo 7 días después de la inducción. A su vez, la dosis inseminante se depositó en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con la presencia de folículo dominante, de forma similar a nuestro estudio. Al descongelar las muestras con ambos diluyentes la movilidad espermática observada fue similar a los valores obtenidos en nuestro estudio: $22,5 \pm 9,3\%$ versus Green/clear camel buffer[®] $17,4 \pm 7,1\%$; y Biladyl A&B[®] $21,3 \pm 3,3\%$ (media \pm DE). Otro reporte realizado en la Puna Argentina logró un 7,9% de preñez al inseminar a 38 hembras de llama a tiempo fijo con semen congelado (24 hs pos-inducción de la ovulación) (Aller *et al.*, 2003). Similar a nuestros resultados, estos autores observaron un descenso significativo en la movilidad y la viabilidad espermática al comparar las muestras descongeladas con el semen fresco. El diluyente utilizado en este estudio estaba compuesto por yema de huevo, citrato, glucosa y antibióticos, agregando como crioprotectores glicerol al 6% y dimetilsulfóxido al 8%. Cabe destacar que, en este estudio se indujo la ovulación de las hembras de llama con buserelina, sin la previa determinación de la presencia de un folículo dominante ni por palpación ni por ultrasonografía transrectales. Además, utilizaron una dosis de 25 millones

de espermatozoides totales con una movilidad del 20 al 25%, reportando una dosis inseminante de $8,4 \pm 3,2$ millones de espermatozoides viables (media \pm DE). Dichos valores son similares a los utilizados en nuestro estudio en el que el número de espermatozoides viables totales inseminados fue de $9,4 \pm 7,6 \times 10^6$ espermatozoides/ml (media \pm DE).

Otros autores publicaron preñeces en alpaca utilizando semen congelado-descongelado (Bravo *et al.*, 1996), logrando un 26,3% de preñez utilizando también, un medio a base de yema de huevo, glucosa, citrato y glicerol al 7%. Dicho trabajo al igual que el de Aller *et al.* (2003) utilizó una curva lenta de congelamiento con periodos de equilibrio desde 45 minutos hasta 2 horas de duración a 4-5 °C. En nuestro estudio utilizamos un equilibrio a temperatura ambiente y una curva rápida de descenso de temperatura durante el congelamiento (Fumuso *et al.*, 2018b). Se desconoce la cantidad de espermatozoides viables necesarios para lograr preñeces en CSA con semen congelado. En semen fresco de llama diluido con lactosa y yema de huevo una dosis inseminante de 12 millones de espermatozoides vivos totales son suficientes para lograr preñez (Giuliano *et al.*, 2012). Sin embargo, en nuestro estudio al inseminar una cantidad similar de espermatozoides vivos congelados/descongelados (9,4 millones de espermatozoides vivos totales) no se obtuvieron preñeces. Giuliano *et al.* (2012) reportan que para lograr preñez con semen refrigerado de llama es necesario utilizar una dosis \geq a 76 millones de espermatozoides vivos totales. Es posible que la sobrevivencia de un espermatozoide criopreservado sea menor a la de un espermatozoide de semen fresco procesado para ser inseminado, por lo que sería necesario aumentar el número de espermatozoides vivos al inseminar con semen congelado.



Figura 4. Congelamiento de semen de llama mediante protocolo de Carretero *et al.* (2015).



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams GP, Ratto MH, Huanca W, Singh J. 2005. Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biol Reprod* 73:452- 457.
- Aller JF, Rebuffi GE, Cancino AK, Alberio H. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la movilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Arch. Zootec.* 52:15-23.
- Apichela S, Chaves G, Trasorras V, Carretero MI, Pinto M, Rutter B, Jiménez Díaz M, Agüero A, Miceli DC. 2007. Bulbourethral glands secretions involvement in llama oviduct sperm reservoir formation. *Biocell* 31(2):295.
- Apichela S, Argañaraz ME, Giuliano S, Zampini R, Carretero I, Miragaya M, Miceli D. C. 2014. Llama oviductal sperm reservoirs: Involvement of bulbourethral glands. *Andrología* 46: 290-295.
- Bailey JL, Biloudeu JF, Cormier N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals. A damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 21:1-7.
- Bertuzzi ML, Fumuso FG, Giuliano SM, Miragaya MH, Gallelli MF, Carretero MI. 2020. New protocol to separate llama sperm without enzymatic treatment using Androcoll-E™. *Reprod Domest Anim.* Doi: 10.1111/rda.13755.
- Bogle OA, Carrasco RA, Ratto MH, Singh J, Adams GP. 2018. Source and localization of ovulation-inducing factor/nerve growth factor in male reproductive tissues among mammalian species. *Biol Reprod* 99(6):1194-1204.
- Bravo PW, Ordoñez C, Alarcón V. 1996. Semen processing and freezing of alpacas and llamas. In: 13th International Congress on animal Reproduction (ICAR), Sydney, Australia.
- Bravo PW, Pacheco C, Quispe G, Vilcapaza L, Ordoñez C. 1999. Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. *Arch Androl* 43:39-246.
- Bravo PV, Callo P, Garnica J. 2000. The effect of enzymes on semen viscosity in Llamas and Alpacas. *Small Rum Res* 38:91-95.
- Bravo PW. Reproductive anatomy and physiology in the male. *In: Llama and alpaca care. Medicine, surgery, reproduction, nutrition and Herd Health.* Cebra C, Anderson DE, Tibary A, Van Saun RJ, Johnson LW. First edition, 2014. Editorial Elsevier.
- Bromfield JJ. 2014. Seminal fluid and reproduction: much more than previously thought. *J Assist Reprod Genet* 17:17.



- Brown BW. 2000. A review on reproduction in South American camelids. *Anim Reprod Sci* 58:169-195.
- Carretero MI, Neild D, Ferrante A, Caldevilla M, Arraztoa C, Fumuso F, Giuliano S. 2015a. Effect of cryoprotectant and equilibration temperature on *Lama glama* sperm cryopreservation. *Andrología* 47:685-693.
- Carretero M, Fumuso F, Miragaya M, Herrera C, Giuliano S. (2015b). Effect of seminal plasma in *Lama glama* sperm. *Reprod Fertil Dev* 27(1):223.
- Carretero MI, Fumuso FG, Giuliano SM. 2016. Efecto del plasma seminal en la conservación de semen en especies de uso zootécnico. *Spermova* 6(2):93-98. Review.
- Carretero MI, Giuliano SM, Arraztoa CC, Santa Cruz RC, Fumuso FG, Neild DM. 2017a. Comparison of two cooling protocols for llama semen: With and without collagenase and seminal plasma in the medium. *Andrologia* 49, e12691.
- Carretero MI, Fumuso FG, Chaves MG, Miragaya MH, Neild DM, Cetica P, Giuliano SM. 2017b. Comparison of two freeze thawing protocols for llama semen: with and without collagenase and seminal plasma in the medium. Preliminary results. *InVet* 19:57.
- Casaretto C, Martínez Sarrasague M, Giuliano S, Rubin de Celis E, Gambarotta M, Carretero MI, Miragaya M. 2012. Evaluation of *Lama glama* semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer. *Andrologia* 44:335-341.
- Castellini C, Mattioli S, Dal Bosco A, Collodel G, Pistilli A, Stabile AM, Macchioni L, Mancuso F, Luca G, Rende M. 2019. *In vitro* effect of nerve growth factor on the main traits of rabbit sperm. *Reprod Biol Endocrinol* 17(1):93.
- Cormier S, Sirard MA, Bailey JL. 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl* 18: 461-468
- Conde PA, Herrera C, Trasorras VL, Giuliano SM, Director A, Miragaya MH, Chaves MG, Sarchi MI, Stivale D, Quintans C, Agüero A, Rutter B, Pasqualini S. 2008. *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Anim Reprod Sci* 109:298-308.
- Chang MC. 1957. A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature* 179:258-259.
- Dacheux JL, Paquignon M. 1980. Relations between the fertilizing ability, motility and maturation process in the boar. *Annals N Y Acad Sci* 438:526-529.



- Dacheux JL, Castella S, Gatti JL, Dacheux F. 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* 63(2):319-341.
- Director A, Giuliano S, Trasorras V, Carretero I, Pinto M, Miragaya M (2007). Electroejaculation in llama (*Lama glama*). *J Camel Prac Res* 14(2):203-206.
- Dunn PF, Picologlou BF. 1977. Variation in human semen viscoelastic properties with respect to time post ejaculation and frequency of ejaculation. *Int J Fertil* 22:217-224.
- De Graaf S, Rickard J, Pini T, Maddison J, Druart X, Leahy T. 2014. Emerging Roles of Seminal Plasma in Sperm Function. 9th Biennial Conference of the Association for Applied Animal Andrology, Newcastle: Association for Applied Animal Andrology 93-101.
- Druart X, Rickard JP, Mactier S, Kohnke PL, Kershaw-Young CM, Bathgate R, Gibb Z, Crossett B, Tsikis G, Labas V, Harichaux G, Grupen CG, de Graaf SP. 2013. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *J Proteomics* 95:13-22.
- Fatnassi M, Cebrinprez J, Salhi I, Prezp R, Seddik M, Casao A, Khorchani T, Muiño-Blanco T, Hammadi M. (2017). Identification of β -nerve growth factor in dromedary camel seminal plasma and its role in induction of ovulation in females. *Emirates J Food Agriculture*, 29(4):293-299.
- Fumuso FG, Giuliano SM, Chaves MG, Neild DM, Miragaya MH, Gambarotta MC, Carretero MI. 2018a. Seminal plasma affects the survival rate and motility pattern of raw llama spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 192:99-106.
- Fumuso FG, Arraztoa CC, Chaves MG, Neild DM, Giuliano SM, Miragaya MH, Carretero MI. 2018b. Inseminación artificial de llamas con semen congelado. *Resultados preliminares. Invet*, 20(1):124.
- Fumuso FG, Giuliano SM, Chaves MG, Neild DM, Miragaya MH, Carretero MI. 2019. Evaluation of the cryoprotective effect of seminal plasma on llama (*Lama glama*) spermatozoa. *Andrología*, 51,e13270.
- Fumuso FG, Chaves G, Neild DM, Miragaya MH, Bertuzzi ML, Carretero MI. 2020. Incubation of frozen-thawed llama sperm with seminal plasma. *Andrologia* 2020;00:e13597.
- Garnica J, Achata R, Bravo PW. 1993. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Anim Reprod Sci* 32:85-90.



- Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. 2008. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). Anim Reprod Sci 104:359-369.
- Giuliano SM, Carretero MI, Gambarotta MC, Neild DM, Trasorras VL, Pinto M, Miragaya MH. 2010. Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. Anim Reprod Sci 118(1):98-102.
- Giuliano SM, Chaves MG, Trasorras VL, Gambarotta M, Neild D, Director A, Pinto M, Miragaya M.H. 2012. Development of an artificial insemination protocol in llamas using cooled semen. Anim Reprod Sci 131:204-210.
- Gwathmey TM, Igotz GG, Mueller JL, Manjunath P, Suarez SS. 2006. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. Biol Reprod 75:50-507.
- Holt WV, North RD. 1991. Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. J Reprod Fertil 91:451-461.
- Jiménez J, Román B, Zurita R, Ugarelli A, Santiani A, Evangelista S. 2016. The effect of seminal plasma concentrations on the oxidative damage in epididimal thawed alpaca spermatozoa. Preliminary assay. Spermova 6(1):82.
- Jones RC, Stewart DL. 1979. The effects of cooling to 5 °C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. J Reprod Fertil 56:233-238.
- Kershaw-Young CM, Maxwell WMC. 2011. The effect of seminal plasma on alpaca sperm function. Theriogenology 76:1197-1206.
- Kershaw-Young CM, Maxwell WMC. 2012 Seminal plasma components in Camelids and Comparisons with other species. Reprod Dom Anim 47(4):369-375.
- Kershaw-Young CM, Stuart C, Evans G, Maxwell W. 2013. The effect of glycosaminoglycan enzymes and proteases on the viscosity of alpaca seminal plasma and sperm function. Anim Reprod Sci 138:261-267.
- Kershaw CM, Evans G, Rodney R, Maxwell WMC. 2017. Papain and its inhibitor E-64 reduce camelid semen viscosity without impairing sperm function and improve post-thaw motility rates. Reprod Fertil Dev 29:1107-1114.
- Leahy T, Evans G, Maxwell WMC, Marti JI. 2010. Seminal plasma proteins do not consistently improve fertility after cervical insemination of ewes with



- non-sorted or sex- sorted frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 22:606-612.
- Lichtenwalner A, Woods GL, Weber J.A. 1996. Seminal collection, seminal characteristics and pattern of ejaculation in llamas. *Theriogenology* 46: 293-305.
- Linfor JJ, Meyers SA. 2002. Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single cell gel electrophoresis. *J Androl* 23:107-113.
- Manjunath P, Thérien I. 2002. Role of seminal plasma phospholipids-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 58:109-119.
- Maxwell WMC, Johnson LA. 1997. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation. *Mol Reprod Dev* 46: 408- 418.
- Maxwell WMC, Evans G, Mortimer ST, Gillan L, Gellatly ES, McPhie CA. 1999. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 11:123-126.
- Maxwell WMC, de Graff SP, El-Hajj Ghaoui R, Evans G. 2007. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Society of Reproduction and Fertility supplement* 64:13-38.
- Morton KM, Vaughan JL, Maxwell WMC. 2008. Continued development of artificial insemination technology in Alpacas. Rural Industries Research and Development Corporation: Kingston, ACT.
- Morton KM, Gibb Z, Leahy T, Maxwell WMC. 2012. Effect of enzyme treatment and mechanical removal of alpaca (*Vicugna pacos*) seminal plasma on sperm functional integrity. *J Camelid Sci* 5:62-81.
- Muiño-Blanco T, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA. 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod Dom Anim* 43:18-31.
- Neild DM, Gadella BM, Chaves MG, Miragaya MH, Colenbrander B, Agüero A. 2003. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology* 59(8):1693-1705.
- Nöthling JO, Shuttleworth R, de Haas K, Thompson PN. 2005. Homologous prostatic fluid added to frozen-thawed dog spermatozoa prior to



- intravaginal insemination of bitches resulted in better fertility than albumin-free TALP. *Theriogenology* 64(4):975-991.
- O' Meara CM, Donovan A, Hanrahan JP, Duffy P, Fair S, Evans AC, Lonergan P. 2007. Resuspending ram spermatozoa in seminal plasma after cryopreservation does not improve pregnancy rate in cervically inseminated ewes. *Theriogenology* 67:1262-1268.
- Pérez LJ, Valcárcel A, de las Heras MA, Moses D, Baldassare H. 1996. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation *in vitro* as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology* 46:131-140.
- Rasul Z, Ahmad N, Anzar M. 2001. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J Androl* 22:278-283.
- Rath D, Knorr C, Taylor U. 2016. Communication requested: boar semen transport through the uterus and possible consequences for insemination. *Theriogenology* 85:94-104.
- Ratto M, Huanca W, Singh J, Adams GP. 2006. Comparison of the effect of natural mating, LH and GnRH on interval to ovulation and luteal function in llamas. *Anim Reprod Sci* 91:299-306.
- Rodríguez-Martínez H, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L, Calvete J.J. 2011. Seminal plasma proteins: what role do they play? *Am J Reprod Immunol* 66:11-22.
- Sabatini C, Mari G, Mislei B, Love C, Panzani D, Camillo F, Rota A. 2014. Effect of post-thaw addition of seminal plasma on motility, viability and chromatin integrity of cryopreserved donkey jack (*Equus asinus*) spermatozoa. *Reprod Dom Anim* 49:989-994.
- San-Martin M, Copaira M, Zuniga J, Rodriguez R, Bustinza G, Acosta L. 1968. Aspects of reproduction in the alpaca. *J Reprod Fertil* 16:395-399.
- Santiani A, Evangelista Vargas S, Valdivia Cuya M, Risopatrón González J, Sánchez Gutiérrez R. 2013. Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. *Theriogenology* 79:842-846.
- Sari LM, Zampini R, Argañaraz ME, Carretero MI, Fumuso FG, Barraza DE, Apichela SA. 2018. Expression of β -NGF and high affinity HNF receptors (TrKA) in Llama (*Lama glama*). Male reproduction tract and spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 85:934-944.



- Schjenken JE, Robertson SA. 2014. Seminal fluid and immune adaptation for pregnancy- comparative biology in mammalian species. *Reprod Dom Anim* 3:27-36.
- Stuart CC, Vaughan JL, Kershaw CM, de Graff SP, Bathgate R. 2019. Effect of diluent type, cryoprotectant concentration, storage method and freeze/thaw rates on the post-thaw quality and fertility of cryopreserved alpaca spermatozoa. *Scientific reports* 9:12826.
- Suzuki K, Asano A, Eriksson B, Niwa K, Nagai T, Rodriguez-Martinez H. 2002. Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus- oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *Androl* 25:84-93.
- Tanco VM, Ratto MH, Lazzarotto M, Adams GP. 2011. Dose- response of female llamas to ovulation-inducing factor from seminal plasma. *Biol Reprod* 85(3):452-456.
- Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlasi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L, Calvete JJ. 1998. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 30:217-224.
- Trasorras V, Giuliano S, Chaves G, Neild D, Agüero A, Carretero MI, Santa Cruz R, Baca Castex C, Alonso A, Pinto M, Morrell M, Miragaya M. 2012. *In vitro* embryo production in llamas (*Lama glama*) from *in-vivo* matured oocytes with fresh semen processed with Androcoll- E™ using defined embryo culture media. *Reprod Dom Anim* 47:562-567.
- Trasorras V, Baca Castex C, Alonso A, Giuliano S, Santa Cruz R, Arraztoa C, Chaves G, Rodríguez D, Neild D, Miragaya M. 2014. First llama (*Lama glama*) pregnancy obtained after in vitro fertilization and in vitro culture of gametes from live animals. *Anim Reprod Sci* 148:83-89.
- Watson PF. (2000). The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60:481-492.
- Vaughan J, Galloway D, Hopkins D. 2003. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). RIRDC Rural Industries Research and Development Corporation, Pub. N° 03/104, Kingston, Australia.
- Von Baer L, Hellemann C. 1998. Variables seminales en llama (*Lama glama*). *Arch Med Vet* 30.



MARÍA IGNACIA CARRETERO, FERNANDA GABRIELA FUMUSO Y MARÍA SUSANA GIULIANO

Zampini R, Sequeria S, Argañaraz M, Apichela SA. 2017. SL15: A seminal plasma-derived lectin from the sperm of llama (*Lama glama*). Mol Reprod Dev 9999:1-9.

Zea F, Pérez G, Maquera Z, Pacheco J. 2015. Restauración del plasma seminal en espermatozoides colectados del conducto deferente de alpaca (*Vicugna pacos*). Libro de resúmenes del VII congreso mundial en Camélidos Sudamericanos. Puno, Perú. 7: 61.