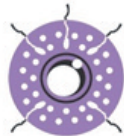


## SUPLEMENTO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Chorroarín 280 (C1427CWO) Bs. As., Argentina. Tel.(54 11) 4524 8400.  
www.fvet.uba.ar



### INITRA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN  
Y TECNOLOGÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL  
Facultad de Ciencias Veterinarias UBA

## USO DE LA ECOGRAFÍA DOPPLER COLOR PARA LA EVALUACIÓN DE LOS ÓRGANOS REPRODUC- TORES DE MACHOS DE LLAMA (*LAMA GLAMA*) Y SU RELACIÓN CON PARÁMETROS SEMINALES

Amusquibar, M.V. <sup>(1)</sup>; Carretero, M.I. <sup>(1,2)</sup>; Fumuso, F.G. <sup>(3)</sup>; Bertuzzi, M.L. <sup>(1,2)</sup>; Arraztoa, C.C. <sup>(1)</sup>

Los Camélidos Sudamericanos (CSA) son especies autóctonas del altiplano. Se encuentran entre los animales con mayor capacidad de adaptación a los ambientes adversos y constituyen una fuente importante de recursos, principalmente fibra, carne y piel para muchas familias que viven en dicha región. En Argentina, la llama es el CSA doméstico más numeroso. En los últimos años, se incrementó el interés en estos animales, principalmente desde la industria farmacéutica, debido a un tipo de anticuerpos que producen, llamados "nanoanticuerpos", por lo que su demanda está en aumento y extendiéndose a la zona de llanuras. En dicha zona, la reproducción de la especie no presenta estacionalidad, ya que la oferta de alimento es constante durante todo el año. Sin embargo, en el altiplano, presentan una estacionalidad reproductiva, que acompaña a las épocas de mayor oferta forrajera. Cuando los servicios se realizan en épocas con alta humedad y altas temperaturas ambientales, se puede generar un estrés por calor e infertilidad en los machos, posiblemente debido a diferencias anatómicas escrotales en estas especies en comparación con otros mamíferos. En los camélidos, el escroto está ubicado en la zona del periné, cerca del cuerpo y presenta una piel gruesa, probablemente para evitar lesiones durante las peleas entre los machos <sup>(5)</sup>. Como ocurre con la mayoría de las especies domésticas, los criadores de camélidos se esfuerzan por mejorar la salud, la producción y las características reproductivas de sus animales a través de programas de reproducción cuidadosamente monitoreados. Desafortunadamente, hay varios aspectos de la fisiología reproductiva de los camélidos que hacen que su cría sea especialmente difícil. En comparación con otras especies domésticas, los camélidos tienen bajas tasas de fertilidad y preñez. Por ejemplo, sólo entre el 40% y el 60% de los apareamientos naturales dan como resultado descendencia <sup>(1)</sup>. La evaluación de los órganos reproductivos del macho es esencial para poder detectar alteraciones que podrían afectar negativamente el desempeño de estos, durante el servicio. El examen particular de los órganos genitales externos en la llama debe incluir la inspección visual y palpación del escroto, los testículos, el prepucio y el pene. El escroto debe estar libre de heridas y sin indicios de inflamación. Ambos testículos deben reposar completamente dentro del escroto, deslizarse libremente dentro de éste y ser de tamaño similar. Deben estar bien desarrollados y es ideal elegir como reproductores los machos que posean testículos más grandes que el promedio para los machos de la misma edad. Al tacto, los testículos deben ser firmes, elásticos y turgentes. Al palparlos suavemente, el macho no debe dar la

(1) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Av. Chorroarín 280, Buenos Aires, Argentina.

(2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

(3) Department of Veterinary and Biological Sciences, University of Minnesota, St. Paul, MN, USA.

impresión de sentir dolor, ni se debe sentir que se encuentran más calientes que el resto del cuerpo. Debe constatarse que no haya heridas en el prepucio, úlceras, afecciones de la piel, ni secreciones purulentas. El pene debe deslizarse libremente dentro del prepucio y estar claramente libre de adherencias. Los machos que tengan adherencias no deben destinarse a la reproducción. Por otro lado, se describe la presencia de glándulas sexuales accesorias que tienen un rol fundamental en la conformación y la composición del plasma seminal; siendo estas la próstata y glándulas bulbouretrales. Las técnicas utilizadas para diagnosticar la infertilidad en llamas son desafiantes. Si bien una evaluación seminal en otras especies productivas es una práctica estándar previa a la venta de un reproductor o cuando se sospecha de infertilidad en el mismo, la evaluación seminal rara vez se realiza en camélidos, debido en parte, a las dificultades en la recolección y el análisis del semen. El servicio natural en estas especies presenta particularidades. No existe un cortejo previo <sup>(10)</sup> y la monta se realiza con la hembra en decúbito esternal y el macho se sienta sobre la grupa de la hembra abrazándola con los miembros anteriores. En camélidos, la eyaculación es un proceso continuo que ocurre durante la cópula y dura de 5 a 50 minutos <sup>(9)</sup>. En centros de investigación, se han empleado diferentes métodos de extracción de semen en los CSA, siendo la vagina artificial y la electroeyaculación los más utilizados. La vagina artificial debe colocarse dentro de un maniquí con posición copulatoria <sup>(14)</sup> y la misma debe tener la capacidad de mantener la temperatura corporal durante todo el período de la cópula. No obstante, esta técnica presenta el desafío de requerir el entrenamiento de los machos, siendo que algunos no aceptan fácilmente el maniquí. Adicionalmente, en situaciones donde es necesario recolectar semen de machos que residen en lugares distantes a los centros de investigación, no siempre se cuenta con el tiempo y las facilidades necesarias para llevar a cabo el entrenamiento. Para la colecta de semen por electroeyaculación no se requiere un entrenamiento previo del macho, pero se necesita de un protocolo de anestesia general y, por lo tanto, de profesionales experimentados en la misma. Dichas muestras poseen mayor volumen, movilidad espermática, integridad de membrana y con una menor proporción de cabezas espermáticas sueltas, que la obtenida con vagina artificial <sup>(7)</sup>. Con respecto a las características seminales, los CSA también presentan aspectos únicos, ya que el semen presenta bajo volumen, baja concentración, presenta filancia y elevada viscosidad estructural con baja o nula movilidad progresiva, predominando la movilidad oscilatoria. Por lo tanto, sería interesante incorporar nuevas herramientas que permitan realizar una correcta y completa evaluación reproductiva de los machos camélidos, siendo aún más interesante su aplicación a campo.

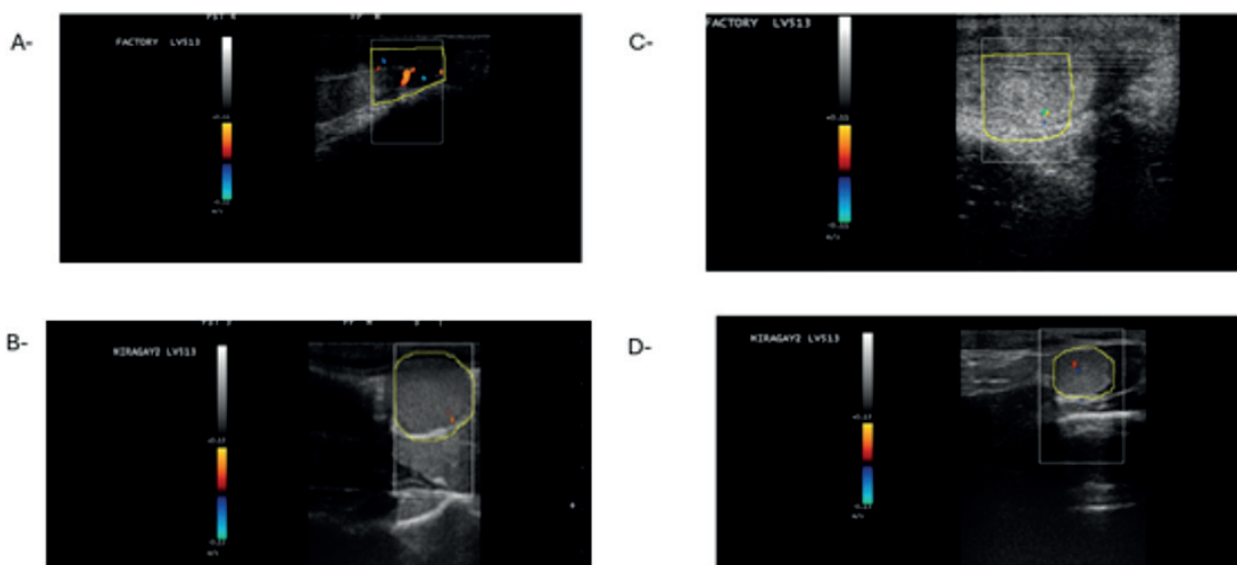
La evaluación de la irrigación sanguínea de los órganos reproductivos es una herramienta que permite realizar un examen andrológico más completo. La ecografía Doppler es una técnica no invasiva, ampliamente utilizada en clínica reproductiva en humanos, dado que permite no solo evaluar la estructura bidimensional de los diferentes órganos (modo-B), sino que también ofrece la posibilidad de observar la vascularización de los mismos (modo Doppler) en tiempo real. En los últimos años, la ecografía Doppler fue ganando terreno también en el campo de la investigación en reproducción de grandes animales <sup>(6)</sup>. Existen reportes en alpaca, donde se observaron mayores niveles de irrigación en el tracto reproductor de machos fértiles con respecto a los infértiles <sup>(9)</sup>. Por otro lado, existen trabajos científicos donde relacionan el tamaño de las glándulas reproductivas de llamas machos, con el peso del animal adulto <sup>(13)</sup>. Sin embargo, existe escasa información acerca del estudio del flujo sanguíneo de los mismos. Por lo tanto, el objetivo de nuestro grupo de investigación fue evaluar la irrigación sanguínea de los órganos reproductores en machos adultos de *Lama glama*, utilizando la ecografía Doppler color, comparando la irrigación del lado derecho con respecto al lado izquierdo en aquellos órganos reproductores pares y correlacionando dichos resultados con parámetros seminales.

## Nuestra experiencia

### Ecografía Doppler color de los órganos genitales en el macho

En nuestro laboratorio se utilizó la técnica de ecografía Doppler color para evaluar la irrigación sanguínea de los órganos reproductores de machos adultos de llama. Se utilizó un equipo eco-Doppler

Esaote® y un transductor lineal de 5 MHz. Las revisiones se realizaron bajo anestesia general (0,2 mg/kg Xilacina y 1,5 mg/kg Ketamina, vía endovenosa), para facilitar la correcta evaluación. Se ecografiaron ambos testículos (T), sus respectivos plexos pampiniformes (PP) y las glándulas sexuales accesorias: bulbouretrales (BU) y próstata (P). Se realizaron ecografías a un total de 10 machos adultos de llama con fertilidad probada, de entre 6 a 12 años. Las imágenes se obtuvieron grabando videoclips de 5 segundos, que fueron examinados cuadro por cuadro (Adobe Premiere Pro CS6®) para seleccionar 3 imágenes que mostraran la máxima señal Doppler para cada órgano, las cuales fueron guardadas en formato TIFF (Figura 1). Finalmente, cada imagen fue procesada objetivamente utilizando el software Image J. 1.52i (National Institute of Health, USA) para medir las áreas de color (mm<sup>2</sup>) en relación con el área total del órgano en estudio. De esta manera, se determinó el porcentaje de área con flujo sanguíneo (PFS%) como la sumatoria de las áreas de color dentro del área total de la imagen de los órganos, tal como fue descrito por Rawy y col. <sup>(12)</sup> en dromedarios.



**Figura 1.** Imágenes ecográficas de órganos reproductores de machos de llama obtenidas con ecografía Doppler. A-Plexo pampiniforme B-próstata C-testículo D- Glándula Bulbouretral.

### Obtención y evaluación del semen

Se realizó la extracción de semen mediante electroeyaculación, previa anestesia general (0,2 mg/kg Xilacina y 1,5 mg/kg Ketamina, vía endovenosa)<sup>(3)</sup>. Antes de realizar la maniobra de extracción, se indujo la micción de los machos, para evitar la contaminación del semen con orina. Se evaluaron las siguientes características seminales: volumen, movilidad, concentración espermática, viabilidad y estado acrosomal. El volumen de los eyaculados se evaluó mediante el uso de una micropipeta. La movilidad espermática se observó entre porta y cubreobjetos sobre una platina térmica a 37 °C, utilizando microscopio de contraste de fase (100x). Los patrones observados se clasificaron en: movilidad oscilatoria (MO) y movilidad progresiva (MP), considerando para el análisis estadístico la movilidad total (sumatoria de la MO y la MP). La concentración espermática se calculó utilizando una cámara hemocitométrica de Neubauer. Para la evaluación de la viabilidad y estado acrosomal en conjunto, se realizó una tinción dual de FITC-PNA/Pi (Isotiocianato de Fluoresceína conjugado con *Arachis hypogaea* agglutinin/Ioduro de Propidio) descrita por Carretero y col. <sup>(2)</sup>. Los espermatozoides fueron clasificados en cuatro categorías: espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VI), vivos con acrosoma reaccionado (VR), espermatozoides muertos con acrosoma intacto (MI) y espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado (MR).

La ecografía Doppler color de los órganos sexuales de los machos se realizó luego de la extracción de semen, para aprovechar la sedación general de los animales.

## Nuestro avance

Se comparó estadísticamente el PFS% de los órganos pares entre sí, mediante una prueba T de Student apareada, en la cual se observó una diferencia significativa ( $p \text{ valor} \leq 0,05$ ) entre la glándula bulbouretral izquierda y derecha, dando mayor irrigación la glándula bulbouretral izquierda (Tabla 1).

Por otro lado, se analizó si existía correlación entre el promedio del PFS% de los órganos pares (testículos y glándulas bulbouretrales) y el PFS% de la próstata con los parámetros de calidad seminal analizados: movilidad total (MT), espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VI) y número total de espermatozoides. Para ello, se utilizó el test de Pearson, ya que todas las variables presentaron una distribución normal. Las características seminales evaluadas estuvieron dentro del rango normal para la especie (volumen:  $1,1 \pm 0,7$  ml; MT:  $50,6 \pm 18,2\%$ ; VI:  $58,9 \pm 14,2\%$ , número total de espermatozoides:  $145,97 \pm 186,72 \times 106$ , media  $\pm$  desvío estándar). Se detectó una correlación negativa entre el PFS% de las BU con respecto a la MT ( $p= 0,01$ ;  $r= -0,76$ ) y a los espermatozoides VI ( $p= 0,02$ ;  $r= -0,70$ ). Esto indicaría que ante un aumento de flujo sanguíneo en la glándula bulbouretral, los valores de movilidad y viabilidad espermática descenderían. Se han realizado estudios donde se identificaron varias proteínas presentes en el plasma seminal de los camélidos<sup>(4)</sup>. Una de ellas, la mucina 5B, fue identificada como una proteína formadora de mucosidad y la fuente de esta proteína sería las glándulas bulbouretrales. La revisión de la literatura sugiere fuertemente que la mucina 5B sería la responsable de la presencia de filancia en el plasma seminal de los CSA<sup>(8)</sup>. Por otra parte, debido a que el patrón de movilidad espermática característico en los eyaculados de CSA es el oscilatorio, durante mucho tiempo se postuló que este tipo de movilidad se debía a una acción mecánica ejercida por el plasma seminal, debido a su elevada filancia. Sin embargo, en estudios posteriores se determinó que serían señales de tipo bioquímicas las que influirían en el patrón de movilidad de los espermatozoides de CSA<sup>(1)</sup>. En este sentido, nos parece interesante continuar investigando y evaluando si las correlaciones observadas en este estudio preliminar se mantienen al aumentar el número de animales muestreados, con el objetivo de conocer la influencia de la irrigación de los órganos reproductores y en especial, de las glándulas bulbouretrales, en los parámetros espermáticos de llama.

## Bibliografía

1. Bertuzzi, M.L., Fumuso, F.G., Giuliano, S.M., Miragaya, M.H., Gallelli, M.F., Carretero, M.I. (2020). New protocol to separate llama sperm without enzymatic treatment using Androcoll-ETM. *Reprod. Domest. Anim.* 55(9): 1154-1162.
2. Carretero, M.I., Fumuso, F.G., Neild, D., Giuliano, S.M., Cetica, P., Miragaya, M. (2015). Evaluation of the acrosomal status in Lama glama sperm incubated with acrosome reaction inducers. *Anim. Reprod. Sci.* 160: 1-11.
3. Director, A., Giuliano, S., Carretero, M.I., Pinto, M., Trasorras, V., Miragaya, M. (2007). Electroejaculation in llama (Lama glama). *J. Camel Pract. Res.* 14, 203–206.
4. Druart, X., Rickard, J.P., Mactier, S., Kohnke, P.L., Kershaw-Young, C.M., Bathgate, R., Gibb, Z., Crossett, B., Tsikis, G., Labas, V., Harichaux, G., Grupen, C.G., de Graaf, S.P. (2013). Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *J Proteomics* 95: 13-22.
5. Fowler, M.E. (1998). *Medicine and surgery of South American camelids: llama, alpaca, vicuna, guanaco* (No.

**Tabla 1.** Porcentaje de área de flujo sanguíneo (PFS%) en órganos reproductivos de machos adultos de llama, evaluados mediante ecografía Doppler (media  $\pm$  desvío estándar).

Órgano reproductor evaluado	PFS%
Testículo Izquierdo	$1,5 \pm 0,8^a$
Testículo Derecho	$0,9 \pm 0,7^a$
Plexo pampiniforme izquierdo	$9,5 \pm 4,0^a$
Plexo pampiniforme derecho	$8,4 \pm 5,3^a$
Bulbouretral Izquierda	$2,9 \pm 1,3^a$
Bulbouretral Derecha	$2,2 \pm 1,1^b$
Próstata	$0,5 \pm 0,4$

a, b Letras diferentes indican diferencias significativas entre la región izquierda y la derecha para cada par de órgano reproductivo (testículos, plexos pampiniformes y glándulas bulbouretrales).

Ed. 2). Iowa State University Press.

6. Ginther, O.J. (2014). How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. In *Theriogenology* (Vol. 81, Issue 1, pp. 112–125). 10.1016/j.theriogenology.2013.09.007
7. 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(2-4): 359-369.
8. Kershaw-Young C.M., Maxwell W.M.C. (2012). Seminal plasma components in Camelids and Comparisons with other species. *Reprod. Dom. Anim.* 47: 369-375.
9. Kutzler, M., Tyson, R., Grimes, M., Timm, K. (2011). Determination of testicular blood flow in camelids using vascular casting and color pulsed-wave Doppler ultrasonography. *Veterinary medicine international*, vol. 2011, Article ID 638602, 7 pages, 2011, 10.4061/2011/638602
10. Lichtenwalner, A. B.; Woods, G. L.; Weber, J. A. (1996). Seminal collection, seminal characteristics and pattern of ejaculation in llamas. *Theriogenology* 46: 293-305.
11. Quispe T.L. (1996). Mating systems in alpacas. *Revista Argentina de Producción Animal*, 16 (4): 357–361.
12. Rawy, M. S., Derar, D. R., El-Sherry, T. M., Megahed, G. A. (2012). Characterisation of follicular and luteal blood flow in female dromedary camel induced to ovulate using GnRH analogue. *J. Camel Pract. Res.* 19(2): 269-275.
13. Sánchez, A.E., Correa J.E. (1995). Descripción ecográfica preliminar de próstata y glándulas bulbouretrales en tres machos llama. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 27 (1): 81-86.
14. Sumar, J., Leyva, V. (1981). Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*Lama pacos*). *Memorias del IV convención internacional sobre camélidos sudamericanos*. Punta Arenas.p.3. Chile.