

Manejo escéptico de las soluciones diluyentes durante la obtención de espermatozoides de *Apis mellifera*.

Cristóbal Corredor-Rincón. Universidad Nacional de Colombia; Bogotá Colombia.

em: cristobalcr2001@gmail.com; Tel 312-4805264

Resumen. Se ha diseñado un circuito hidráulico para el manejo de las soluciones diluyentes isotónicos estériles, (Corredor-Rincón y Corredor-Camargo 2011), utilizables en la extracción del semen de machos sexualmente adultos. El circuito hidráulico es acoplado al Inseminador instrumental tradicional y consta de: **A)** Depósito de solución diluyente de 10 ml. **B)** Llave selectora de tres vías. **C)** Sistema de succión-inyección mecánica, a) macro (0.1–1.0 ml) y b) micro (2–30 µl) acoplado a una jeringa de 1 ml. Este circuito alimenta los requerimientos de solución diluyente estéril necesaria para la micro pipeta de vidrio colectora de espermatozoides de la superficie del endóforo de *Apis mellifera*. Adicionalmente se ha diseñado un soporte carpiano ajustable, (vertical y horizontalmente) para la mano del operario, reduciéndole: **a)** el cansancio y la posibilidad de contraer lesiones inflamatorias neuromuscular, en la zona del túnel del carpo y **b)** reduciéndole considerablemente la exposición a sustancias alergénicas presentes en las excretas liberadas durante la manipulación de los órganos genitales del macho. El circuito hidráulico es esterilizable con vapor de agua, previo a su uso. Se propone una metodología sencilla para la fabricación artesanal de micropipetas desechables de vidrio.

Abstract. A Hydraulic circuitry for handling the semen diluents for honeybee instrumental insemination was designed and built. This equipment meets the ergonomic needs of the operator during the male-sperm collection and the asepsis of the procedure. The main parts of the equipment are: **1).** Hydraulic circuit with fine controls (from 1 – 100µl) for the aseptic extraction of semen from adult *A. mellifera* drones. **2).** A horizontal/vertical adjustable support for the left hand-carp of the operator during semen collection. All these elements are metallic and allow thermal or chemical/cleansing disinfection. A simple technique for manufacturing disposable glass micro micropipettes is described. This equipment meets the technical requirements for research technology in skillful hands

Introducción

La obtención de líquido-células espermáticas de *Apis mellifera*, con la mínima contaminación microbiológica es requisito sanitario, (Andere et al 2011) indispensable para asegurar mayor éxito en la fecundación asistida de reinas vírgenes. El riesgo de contaminar el semen con microorganismo patógenos bacterianos o virales, de origen endógeno o exógeno (Milius 2010), tanto del insecto macho, del operario y/o del ambiente, pueden estar epidemiológicamente asociadas a los centros de inseminación instrumental de reinas, o áreas endémicas

La implantación de buenas prácticas de manejo biológico aquí propuestas reduce la diseminación de patologías apícolas dada el la gran demanda internacional de reinas fecundadas. Se requiere de innovaciones tecnológicas para optimizar la fecundación asistida de abejas genéticamente promisorias, (Harbor 1985, 1990; Loke Peng 1993; Lodesani, Balduzzi & Galli 2004; Phiahncharoen et al 2004)

Materiales y Métodos

Se tomaron machos sexualmente maduros de *A. mellifera* para la obtención y manejo de los espermatozoides, siguiendo la metodología propuesta por Andere et al (2011); Covey et al (2007^a, 2007^b), Collins et al. (2006); Harbor (1990)

Se utilizó el sistema hidráulico-mecánico utilizado en el Inseminador Instrumental Christmas Tree Type, (Corredor-Rincón y Corredor-Camargo 2011). Este circuito consta de una jeringa plástica de 10 ml, un sistema de mangueritas plásticas (venoclisis), una jeringa de 1000µl y un sistema micrométrico de bombeo-succión de control macro (0.1-0.5 ml) y micro (3-20 µl). Detalles mecánicos se pueden observar en la Fig. 1.

Resultados y Discusiones

Sistema Hidráulico: Ensamblado correctamente cada uno de los componentes del sistema hidráulico-mecánico, (jeringa de 10 ml, y 1000 µl; válvula metálica de tres vías; micropipeta de vidrio de 70 µl y micropipeta de vidrio con punta fina) y sus mangueras (polietileno) por medio de uniones cónicas, (Fig. 2), se procedió a esterilizarlo con vapor de agua (110°C)

Por el extremo libre de la manguera de venoclisis, acoplada previamente a la entrada de la **jeringa reservorio**, se va succionando el diluyente estéril, hasta almacenar un volumen de trabajo de 10 ml, (Fig.1). Se remueve el embolo de la jeringa y se reemplaza por un tapón estéril de algodón. Para la interconexión entre las dos jeringas, se acopla el extremo libre de la manguera de venoclisis al empate cónico (hembra) de entrada de la válvula de tres vías, previamente empata a la entrada de la jeringa de 1000 µl por su empate cónico (hembra)

Con el avance rápido horizontal de la **Perilla Dosificadora Micrométrica, (PDM)**, (Fig. 3), se hace deslizar el embolo elástico de la jeringa de 1000 µl, lo cual permite succionar la solución estéril del diluyente, hasta llenarla completamente

Seguidamente accionando selectivamente la válvula de tres vías (Fig. 2), se interconecta la jeringa de los 1000 µl con la micropipeta de 70 µl de almacenamiento, la cual ya se había conectado a través de una unión elástica hermética con la **micropipeta de punta fina** o de recolección. El llenado de esta sección del circuito hidráulico se hace **girando la PDM**. Así se va inyectando la solución diluyente sin cámaras de aire.

La eliminación de cámaras de aire de este circuito se hace utilizando sincronisadamente el *avance macrométrico de la perilla*, por desplazamiento **horizontal** de ésta y la llave de tres vías. Accionando la *vía uno* para el llenado por succión y la *vía dos*, para eliminar las cámaras de aire de la jeringa micrométrica por bombeo (Fig.3). Esta operación se repite hasta asegurarse la completa eliminación de aire dentro del sistema hidráulico, evitando siempre succionar aire del ambiente séptico. Las gotas del exceso se recogen colocando una mota de algodón o gasa estériles en la punta de la **micropipeta de vidrio colectora**, evitando humedecer el equipo y área de trabajo

Recolección del semen Para esta operación se requiere fabricar micropipetas colectoras desechables de vidrio a partir de micropipetas hematocrito de vidrio, (Corredor-Rincón y Corredor-Camargo 2011). Se sostiene una micropipeta-hematocrito con los dedos de ambas manos firmemente y se le calienta su punto medio bajo una **llama fina** (Fig. 4) hasta obtener el punto de fusión del vidrio, reconocido por su color rojo uniforme local. En este momento se retira de la llama e inmediatamente se estiran los extremos hasta producir un leve adelgazamiento en la sección del vidrio calentado al rojo. Una vez enfriado el material adelgazado, se parte la micropipeta por el centro haciendo un leve arqueado de la misma. Se vuelve a colocar la punta fina de cada micropipeta sobre la llama para rebordear el extremo eliminando áreas cortantes, operación que debe controlarse para evitar sellar la micro punta. Si esto sucede basta con cortar la punta sellada y volver a rebordearla bajo la llama, Dada la heterogeneidad en la calidad del

vidrio, cada laboratorio debe practicar ensayo-error hasta conseguir el producto deseado. (La fabricación de estas micropipetas exige que el operario siempre porte gafas de seguridad!)

La *micropipeta de vidrio colectora* con sus puntas bien redondeadas, se acoplan a la *micropipeta de almacenamiento* de 70 µl, por medio de una unión hermética elástica. El diámetro de la punta debe permitir fluidamente la recolección del líquido seminal sin hacer daño al tejido externo del endófaló

Una vez elegido el espécimen macho y puesto bajo el campo visual del sistema óptico, se procede a la extracción de los espermatozoides por eversión del endófaló (Colins et al 2006; Covey 2008; Rinderer, Collins and Pesante, 1985. Phiancharoen et al, 2004). Se toma el espécimen con la mano izquierda la cual se apoya sobre el soporte carpiano (Fig. 2), previamente ajustado a la altura y posición ergonómica del operario. (Corredor-Rincón y Corredor-Camargo 2011). Esto facilita la visualización del área seleccionada bajo el campo visual del sistema óptico, eliminando los movimientos incontrolados de la mano, lo cual causa pérdida del área del endófaló seleccionada.

El cansancio visual del operario durante esta manipulación, acompañado de movimientos erráticos son síntomas del deterioro neuromuscular del túnel del carpo, síndrome crónico frecuente en estas labores manuales rutinarias, (Corredor-Rincón y Corredor-Camargo 2011).

Accionando el control de *ajuste micrométrico* por medio de la PDM, (Fig.3), se hace una succión cuidadosa del líquido seminal presente en el endófaló. Aquí podemos tener tres circunstancias operativas: 1). Cuando la consistencia y color del líquido seminal esta bien definida sobre el endófaló. Aquí solo basta con succionar el líquido seminal lenta y cuidadosamente *girando* la PDM, (Fig.3), siempre guiado por la imagen del endófaló presente en el sistema óptico

2). Cuando hay poco líquido seminal acompañado de una capa mucoproteica. Aquí, primero se elige un recorrido horizontal del émbolo de la jeringa con la **guía espacial "d"** (accionando el tornillo L, Fig.3), equivalente a uno dos a tres lambdas de solución. Luego se expele este volumen sobre el área seleccionada del endófaló *alternando una acción expulsión-succión* con la PDM, (Fig. 3). Con esta manipulación el líquido seminal se ha suspendido en la solución diluyente (solución salina), lo más homogéneamente posible y fácilmente succionable con la micropipeta de vidrio, (Kaftanoglu & Peng 1980).

3). Cuando los machos no están bien maduros o por respuestas al entorno o estrés fisiológico, el endófaló presenta escaso líquido seminal y áreas con abundante líquido mucoproteico. Aquí se debe usar *micropipetas de vidrio* con puntas bien redondeadas y de un calibre interno mayor, para facilitar lavar repetidas veces la *micropipeta de vidrio*. Esto se realiza expulsando el líquido mucoproteico enérgicamente con la perilla de avance rápido "**d**" (Fig. 3) y repetir la recolección con el avance micrométrico, hasta obtener un número adecuado de células espermáticas

Esta metodología es de gran utilidad en los análisis de calidad biológica de las células espermáticas, (Capel 2011; Delaney et al 2011), pues reportes detallados han señalado que la falta de asepsia durante la extracción de las células con sustancias diluyentes, (Andere et al 2011; Moritz 1984, Verma 1973; 1976; 1978), afecta los resultados en forma negativa, (Brazzola, Catena, Capel, Palacio, Collins & Andere 2008; Collins, Williaams & Evans 2004; Locke & Peng 1993). Un ejemplo ilustrativo lo comenta Milius (2010), que cuando *Bombus terrestris*, convive con *Apis mellifera* infectada con el virus deformante de las alas, también aquel presenta los síntomas de este virus

El equipo en su conjunto es esterilizable con vapor recalentado ya que sus componentes son metálicos y de polímeros termo resistente y alguno de ellos son plásticos desechables. El uso de cámara de flujo

laminar durante la obtención de las células espermáticas es un complemento técnico muy deseable, excepto cuando el operario presenta rinitis aguda a los componentes volátiles alergénicos de los excrementos del macho, (Corredor-Rincón y Corredor-Camargo 2011).

Al reducir la exposición del operario a sustancias alergénicas que acompañan a los líquidos y excretas del cuerpo del macho, se aumenta la eficiencia de la extracción de semen en los programas de criaderos de reinas mejoradas

Esta técnica permite obtener volúmenes adecuados de células espermáticas para su caracterización físico-química como su motilidad, viabilidad, resistencia osmótica, y resistencia a niveles de pH, (actividad de iones hidrógeno), características que *al correlacionarlos con* los fenómenos fisiológicos analizables “in vitro” sirven para caracterizar la calidad de las células espermáticas de cada especie o raza (Andere et al 2011; Capel 2011; Collins et al 2006; Delaney et al 2011). Sin embargo la utilidad de cualquier innovación tecnológica o genética debe ser validada su eficiencia dentro de la fisiología de la reproducción “in vivo” por medio de la fecundación asistida. Allí la vitalidad de cada célula espermática dentro del reservorio natural de la espermateca, (temperatura corporal, entorno bioquímico y nutricional, capacidad de mezcla intercelular) le ofrece el equilibrio dinámico homeostático para la supervivencia de la especie, (Collins et al 2006; Collins 2000; Delaney et al 2011)

Esta técnica una vez se ha familiarizado con la manipulación de sistema hidráulico, facilita el estudio de diluyentes biocompatibles, (Almeida & Soares 2002; Delaney et al 2011; Lodesani, Baldizzi & Galli 2004; Moritz 1984; Willims & Harbo 1982), tan útiles en los programas de selección y mejoramiento genéticos, (Collins et al 2006), conservación, transporte y caracterización fisicoquímica de células espermáticas; (Bey 1965; Capel 2011)

Finalmente para la inyección de las células espermáticas dentro del ducto vaginal de la hembra se usó **micropipetas de inseminación** estériles cuyo diámetro es más fino y uniforme, (Cobey 1007^a)

Referencias Bibliográficas

Andere Cecilia Irene, Cristina Monteavaro, María Alejandra Palacios, María Catena; Eduardo Mario Rodríguez y Anita Margerite Collins, 2011. *Apis mellifera* semen: bacterial contamination and susceptibility to antibiotics. *Apidologie* 42:551-559

Almeida R, A E Soares, 2002. Usage of green coconut water and different tissue culture media for in vitro honey bee semen storage. (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apoide). *Interciencia* 27:317-321

Bey Eike, 1965. The electrophoretic mobility of sperm cells. In: Cell Electrophoresis. Editor E J Ambrose. Edit. J & A Churchill Ltd. p: 142-151

Brazzola M, M Catena, A M Capel, A Palacios, A Collins, C Andere, 2008. Semen bacteriological quality in *Apis mellifera*. *Biocell* 32(1): 92

Capel Ana María, 2011. Evaluación de la calidad del semen de *Apis mellifera*. Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de La Provincia de Buenos Aires; Tandil, Argentina. Tesis de Grado. pp 73

Cobey Susan, 2007a. Inseminación Instrumental de Abejas Reinas. The Ohio State University. Section of Communications & Technology. Video. www.honeybee.breeding.com

Cobey W Susan, 2007b. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie* 38:390-410

Collins A M, T J Caperna, V Williams W M Garrett and J D Evans, 2006. Proteomic analyses of male contributions to honey bee sperm storage and mating. *Insect Molecular Biology* 15(5), 541–549
Collins A M, 2000. Relationship between semen quality and performance of instrumentally inseminated bee queen. *Apidologie* 31:421-419

Corredor-Rincón Cristóbal & Frank Corredor-Camargo, 2011. CHRISTMAS TREE TYPE INSEMINATOR FOR *Apis mellifera* QUEENS: CHARACTERISTICS OF THE DESIGN AND ERGONOMIC CONSIDERATIONS. Ganador medalla de Bronce. Congreso Internacional APIMONDIA 2011; Buenos Aires Argentina, Septiembre, 2011. Listado de Posters, Poster número 145; p 227.

Delaney Deborah A, Jennifer J Krller, Joel R Caren & David R Tarpy, 2011. The physical, insemination and reproductive quality of honey bee queens (*Apis mellifera*) *Apidologie* 42:1-13

Harbo John R, 1985. The value of single-drone inseminations in selective breeding of honey bees. In: *Apiculture for the 21th Century. Honey Bee Breeding & Physiology Laboratory Agricultural Research Service. USDA .Chapter 1; pp 5. em. jharbo@asrr.arsusda.gov*

Harbo Jhon R, 1990. Artificial mixing of spermatozoa from honeybees and evidence of sperm competition. *J Apic. Res.* 29:151-158

Kaftanoglu O, & Y S Peng, 1980. A washing technique for collecting of honeybee semen. *J Apic. Res.* 19:205-211

Locke S J & Y S Peng, 1993. The effects of drone age, semen storage and contamination on semen quality in the honey bee (*Apis mellifera*). *Physiol. Entomol.* 15:187-192

Lodesani M, D Balduzzi & A Galli, 2004. Functional characterization of semen in honeybee queen, (*A.m. ligustica* S) spermatheca and efficiency of the diluted semen technique in instrumental insemination. *Ital. J Anim. Sci.* 3:385-392

Milius S, 2010. ScienceNews. Web edition; Friday, Decem- 24th.

Moritz R F A, 1984. The effect of different diluents on insemination success in the honeybee using mixed semen. *J. Apic. Res.* 23:164-167

Phiahncharoen Mananya et al, 2004. Instrumental insemination of *Apis mellifera* queens with hetero and conspecific spermatozoa results in different sperm survival. *Apidologie* 35: 503-511

Woyke Jerzy, Jerzy Wilde & Maria Wilde, 2001. *Apis dorsata* drone flights, collection of semen from everted endophalli and instrumental insemination of queens. *Apidologie* 32:407-416

Verma L R, 1974. An ionic basis for a possible mechanism of semen survival in the spermatheca of the queen honey bee (*Apis mellifera* L). *Comp- Biochem. Phy. A.* 44:1325-1331

Verma L R, 1978. Biology of honeybee *Apis mellifera* L. spermatozoa. Effect of different diluents on motility and survival. *J Apic. Research* 9:167-174.

Williams J L & J R Harbor, 1982. Bioassay for diluents of honey bee semen. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 75:457-459