

Artículo de Revisión

INDUCCION DE SUPEROVULACION EN CAMELIDOS

Induction of superovulation in Camelids

Marcelo H. Ratto¹, Mauricio Silva², Teodosio Huanca³, Aida Cordero⁴,
Wilfredo Huanca⁵

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.45>

¹ Ross University School of
Veterinary Medicine,
Department of Biomedical
Sciences, St. Kitts, Basseterre,
West Indies.

² Facultad de Ciencias
Veterinarias, Universidad
Catolica de Temuco, Chile.

³ Estacion Experimental
Quimsachata, INIA- ILLPA,
Puno, Perú,

⁴ Universidad Agraria La Molina,
Perú,

⁵ Facultad de Medicina
Veterinaria, Universidad
Nacional Mayor de San
Marcos, Lima, Perú.

E-mail: mratto@rossvet.edu.kn

RESUMEN

El desarrollo de las técnicas de reproducción asistida en Camélidos Sudamericanos ha sido establecido con bastante lentitud al compararlas con el desarrollo que han tenido en otras especies como son los rumiantes. Sin embargo técnicas como superovulación, transferencia de embriones y fecundación *in vitro* han sido abordadas en los últimos años con resultados bastante alentadores y que podrán en un futuro hacer posible de uso en forma comercial. Similar a los rumiantes las respuestas a los protocolos de superovulación continúan siendo muy variables a pesar de tener un control de la actividad ovárica al comienzo de los mismos. La recuperación de blastocistos eclosionados mediante lavado uterino continúa siendo una limitante para poder manipular al embrión posterior a su colección con otras metodologías como congelación o vitrificación. Un gran paso se ha realizado en lo que respecta a los métodos de colección de semen y su uso para la inseminación artificial o para fecundación *in vitro*. Así también, se ha logrado de obtener ovocitos de animales vivos utilizando punción folicular guiada por ecografía transvaginal. Quizás el impedimento más complejo para lograr un avance significativo del método de fecundación *in vitro* has sido la escasez en la obtención de ovocitos de matadero, una fuente muy importante de material que pudiera ser utilizado para investigación de la misma forma que lo ha sido para los sistemas *in vitro* en rumiantes. La intención de esta revisión es dar a conocer los principales protocolos de superovulación que han sido desarrollados hasta la fecha en llamas y alpacas.

Palabras clave: Superovulación, camélidos, reproducción

REVISIÓN DEL TEMA

Superovulación

Los tratamientos superestimuladores en camélidos han sido realizados mediante el uso de Gonadotropina Coriónica equina (eCG) y Hormona Folículo Estimulante (FSH) durante la fase luteal inducida con GnRH o hCG o creando una fase luteal artificial mediante el uso de progestágenos.). Así mismo, las gonadotropinas han sido administradas durante la fase de receptividad sexual. Luego del tratamiento superestimulador, las hembras son copuladas seguido de una administración de GnRH o Gonadotropina Coriónica humana (hCG) para inducir o re-forzar la ovulación. Los tratamientos superestimuladores pueden ser resumidos de la siguiente manera:

- A. Fase luteal inducida por ovulación (Bourke *et al.*, 1995): GnRH o hCG es administrada ante la presencia de un folículo ≥ 9 mm (día, 0). Una dosis de 1000 IU of eCG es administrada intramuscularmente al día 7. Al día 9 una dosis luteolítica de prostaglandina es administrada y seguido de una dosis de 750 IU of hCG para inducir ovulación cuando los folículos alcancen un diámetro de 9 a 13 mm.
- B. Fase luteal simulada por el uso de progestágenos (Bourke *et al.*, 1992, 1994; Correa *et al.*, 1994; Agüero *et al.*, 2001; Aller *et al.*, 2002): La fase luteal ha sido estimulada por implante de progesterona/progestágenos (CIDR, Norgestomet) o administración diaria de progesterona durante 7 a 12 días. Los tratamientos gonadotróficos consistieron en dosis de 20 mg pFSH (NIH-FSH-P1) intramuscular cada 12 h por 5 días (dosis total de 200 mg) o administración de 1000 IU de eCG, comenzando 48 h previas al retiro de los implantes de progestágenos. Finalmente una dosis de 750 IU de eCG o 8 μ g de GnRH fue aplicada para inducir la ovulación.
- C. Fase sexualmente receptiva (Correa *et al.*, 1997; Ratto *et al.*, 1997): Hembras con manifestación continua de receptividad sexual durante 5 días consecutivos fueron tratadas con una dosis de 20 mg pFSH (NIH-FSH-P1) intramuscular cada 12 horas durante 5 días (dosis total de 200 mg). Posterior a la última dosis de FSH, las hembras fueron tratadas con una dosis de 750 IU of hCG para inducir ovulación.

En un estudio fue comunicado que dosis de 500 y 1000 IU de eCG fueron óptimas para inducir múltiple crecimiento folicular en llamas (Bravo *et al.*, 1995). El número de ovulaciones o cuerpos lúteos ha sido muy variable entre los diferentes tratamientos fluctuando de 2 a más de 11 por animal con un rango de embriones transferibles que van de 0 a 2 por hembra. Recientemente, Bravo *et al.* (2004) comunicó una respuesta ovárica de 3 a 7 cuerpos lúteos y un promedio de 3.9 embriones transferibles en alpacas tratadas con eCG. Sin embargo, este estudio no ha comunicado en forma detallada los protocolos de superestimulación. Basados en estos resultados, se ha mencionado que la colección de embriones en hembras sin estimular podría ser una opción alternativa a este problema (Taylor *et al.*, 2000).

En la Tabla 1 se muestra los diferentes protocolos llevados a cabo en llamas y alpacas

Estatus ovárico y superovulación

El status folicular al momento de comenzar un tratamiento gonadotrófico podría disminuir la variabilidad de la respuesta superovulatoria (Adams, 1999). Se ha comunicado la respuesta ovárica es muy variable cuando los tratamientos son iniciados en presencia de un folículo dominante (Adams, 1994).

Otro aspecto que no se ha corroborado en estas especies es la necesidad de considerar la implementación natural o artificial de una fase luteal durante el tratamiento superovulatorio, situación que es extrapolada de los resultados o tratamientos conducidos en otros rumiantes como bovino/ovino. Recientemente, basados en nuestro previos trabajos de sincronización de ondas foliculares en llamas (Ratto *et al.*, 2003), hemos implementado un tratamiento superovulatorio con el uso de una combinación de LH/eCG para inducir ovulación, la emergencia de una nueva onda folicular y tratamiento gonadotrófico durante la emergencia de la misma. El número de cuerpos lúteos fue de 7.7 ± 0.8 con un promedio de embriones transferibles colectados del 4.9 ± 0.7 (Ratto *et al.*, 2006). En la Tabla 2 se muestran los protocolos llevados a cabo en conjunto con métodos que sincronizan el crecimiento folicular al momento del tratamiento.

En relación a factores que influyen la colección, calidad y transferencia de embriones, se recomienda al lector revisar el trabajo de Vaughan *et al.* (2012) en donde un gran estudio que involucra más de 5000 transferencia de embriones en alpacas, no hubo diferencias significativas en el número y calidad de embriones colectados en hembras con o sin estímulo superovulatorio.

Tabla 1. Protocolos de superovulación administrados bajo diferentes estatus fisiológicos en llamas y alpacas (Ratto *et al.*, 2012).

Especies	N° Donantes	Estatus Fisiológico	Hormona	Embrión viable X donadora	Referencia
Llama	6	Luteal (hCG)	eCG	2.3	Bourke <i>et al.</i> , 1995a
Llama	24	Luteal (GnRH)	eCG	1.4	Bourke <i>et al.</i> , 1995a
Llama	5	Luteal (CIDR)	eCG	2.0	Bourke <i>et al.</i> , 1994
Llama	17	Luteal (norgestomet)	eCG	1.3	Bourke <i>et al.</i> , 1995a
Llama	4	Luteal (norgestomet)	FSH	0	Bourke <i>et al.</i> , 1995a
Llama / alpaca	4/4	Luteal (progesterone)	eCG	0	Correa <i>et al.</i> , 1994
Llama / alpaca	4/4	Luteal (progesterone)	FSH	0.5	Correa <i>et al.</i> , 1994
Llama	19	Luteal (GnRH)	eCG	1.6	Bourke <i>et al.</i> , 1995a
Llama	17	Luteal (norgestomet)	eCG	1.3	Bourke <i>et al.</i> , 1995a
Llama	20	Sexually receptive	FSH	1.8	Correa <i>et al.</i> , 1997; Ratto <i>et al.</i> , 1997
Alpaca	5	Sexually receptive	eCG + hCG	8.2*	Velásquez & Novoa, 1999
Alpaca	5	Luteal (CIDR)	eCG + hCG	17.8*	Velásquez & Novoa, 1999

*: average number of CL determined by laparotomy.

Tabla 2. Control farmacológico del crecimiento folicular seguido de la administración de gonadotrofinas para inducción de superovulación (Ratto *et al.*, 2012).

Especies	N° donantes	Estatus ovárico	Método de control crecimiento folicular	Hormona	Embrión viable/donadora	Referencia
Llama	15	Inhibition of DF	EB + CIDR	eCG	1.8	Aller <i>et al.</i> , 2002
Llama	32	wave emergence	LH induced ovulation	eCG	4.8	Huanca <i>et al.</i> , 2009
Llama	34	wave emergence	LH induced ovulation + MPA	eCG	3.5	Huanca <i>et al.</i> , 2009
Llama	18	wave emergence	MPA	eCG	1.1	Aller <i>et al.</i> , 2010
Llama	18	wave emergence	EB + MPA	eCG	2.4	Aller <i>et al.</i> , 2010
Llama	20	Inhibition of DF	EB + Progesterone	eCG	2.9	Carretero <i>et al.</i> , 2010
Llama	20	Inhibition of DF	Progesterone	eCG	2.6	Carretero <i>et al.</i> , 2010
Llama	10	Absence of DF	Checked by ultrasound	eCG	2.4	Carretero <i>et al.</i> , 2010
Llama	22	Absence of DF	Checked by ultrasound	eCG	3.0	Trasorras <i>et al.</i> , 2011
Alpaca	23	wave emergence	LH induced ovulation	eCG	2.7	Huanca, 2008
Alpaca	22	wave emergence	LH induced ovulation	FSH	2.7	Huanca, 2008

EB: Estradiol Benzoate; DF: Dominant follicle; CIDR: Control internal drug release of 0.33 g of progesterone; MPA: Medroxyprogesterone Acetate.

CONCLUSION

No cabe duda que la respuesta ovárica a los tratamientos de superovulación continúa siendo una limitante al desarrollo de la transferencia de embriones en camélidos. Asimismo la recuperación de embriones tan avanzados limita la aplicación de otras técnicas como de criopreservación lo que hace difícil el movimiento de embriones a nivel internacional. Por lo tanto existe todavía un gran desafío en el desarrollo y establecimiento de protocolos de estimulación y también en la búsqueda de métodos que permitan la recuperación de embriones en estadios más tempranos o métodos de criopresevación que sean compatibles con la supervivencia de los mismos.

REFERENCIAS

- Aba MA, Miragaya MH, Chaves MG, Capdevielle EF, Rutter B, Agüero A. Effect of exogenous progesterone and eCG treatment on ovarian follicular dynamics vicunas (*Vicugna vicugna*). Anim. Reprod. Sci. 2005; 86:153-161.
- Alberio LH, Aller JF. Control y sincronización de la onda folicular mediante la aplicación de progesterona exógena en llamas. Rev. Arg. Prod. Anim. 1996; 16: 325-329.
- Aller JF, Rebuffi GE, Cancino AK. Superovulation response to progesterone-eCG treatment in vicuna

- (*Vicugna vicugna*) in semicaptive conditions. *Theriogenology* 2002a; 57: 576 (Abstract).
- Aller JF, Rebuffi GE, Cancino AK, Alberio RH. Successful transfer of vitrified llama (*Lama glama*) embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 2002b; 73: 121-127.
 - Aller JF, Cancino AK, Rebuffi GE, Alberio RH. Effect of estradiol benzoate used at the start of a progestagen treatment on superovulatory response and embryo yield in lactating and non-lactating llamas. *Anim. Reprod. Sci.* 2010; 119: 322-328.
 - Berland MA, von Baer A, Ruiz J, Parraguez VH, Morales P, Adams GP, Ratto MH. In vitro fertilization and development of cumulus oocytes complexes collected by ultrasound-guided follicle aspiration in superstimulated llamas. *Theriogenology* 2011; 75:1482-1488.
 - Bourke D, Adam C, Kyle C, Young P, Mc Evoy TG. Ovulation, superovulation and embryo recovery in llamas. In: *Proceedings 12th International Congress on Animal Reproduction*, vol. 1, The Hague, Netherlands, pp 1992; 193-195.
 - Bourke D, Adam C, Kyle C, Mc Evoy TG, Young P. Ovarian response to PMSG and FSH in llamas. *European Symposium on South American Camelids*, pp 1994: 75-81.
 - Bourke DA, Kyle CE, Mc Evoy TG, Young P, Adam CL. Superovulatory responses to eCG in llamas (*Lama glama*). *Theriogenology* 1995; 44: 255-268.
 - Bravo PW, Tsutsui T, Lasley BL. Dose response to equine chorionic gonadotropin and subsequent ovulation in llamas. *Small Rumin. Res.* 1995; 18: 157-163.
 - Brogliatti GM, Palasz AT, Rodriguez-Martinez H, Mapletoft RJ, Adams GP. Transvaginal collection and ultrastructure of llama (*Lama glama*) oocytes. *Theriogenology* 2000; 54: 1269-1279.
 - Carretero MI, Miragaya M, Chaves MG, Gambarotta M, Agüero A. Embryo production in superstimulated llamas pre-treated to inhibit follicular growth. *Small Rumin. Res.* 2010; 88: 32-37.
 - Chaves MG, Aba MA, Agüero A, Egey J, Berestin V, Rutter B. Ovarian follicular wave pattern and the effect of exogenous progesterone on follicular activity in non-mated llamas. *Anim. Reprod. Sci.* 2002; 69: 37-46.
 - 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. In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2008; 109; 298-308.
 - Correa J, Ratto MH, Gatica R. Actividad estral y respuesta ovárica en alpacas en llamas tratadas con progesterona y gonadotrofinas. *Arch. Med. Vet.* 1994; 26: 59-64.
 - Correa J, Ratto M, Gatica R. Superovulation in llamas with pFSH and equine chorionic gonadotrophin used individually or in combination. *Anim. Reprod. Sci.* 1997; 46: 289-296.
 - Gatica R, Ratto M, Schuler C, Ortiz M, Oltra J, Correa JE. Cría obtenida en una llama (*Lama glama*) por transferencia de embriones. *Agric. Tec. (Chile)* 1994; 54: 68-71.
 - Huanca T. 2008. Efecto de la administración de gonadotropinas exógenas (FSH y eCG) en la respuesta ovárica y en la producción de embriones en alpacas (*Vicugna pacos*), PhD Tesis. Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, España.
 - Huanca W, Cordero A, Huanca T, Cardenas O, Adams GP, Ratto MH. Ovarian response and embryo production in llamas treated with equine chorionic gonadotropin alone or with a progestin-releasing vaginal sponge at the time of follicular wave emergence. *Theriogenology* 2009; 72: 803-808.
 - Huanca W, Ratto M, Cordero A, Santiani A, Huanca T, Cárdenas O, Adams GP. Respuesta ovárica y transferencia de embriones en alpacas y llamas en la zona altoandina del Perú. *Resumen V Congreso Mundial de Camélidos*, Catamarca, Argentina. 2006.
 - Miragaya MH, Chaves MG, Agüero A. Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Rumin. Res.* 2006; 61; 299-310.
 - Novoa C, Sumar J. Colección de huevos in vivo y ensayo de transferencia en alpaca. In: *3er Boletín extraordinario IVITA*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, pp. 1968; 31-34.
 - Palomino H. Biotecnología del trasplante y micromanipulación de embriones de bovinos y camélidos de los Andes. A.F.A. Editores Importadores, Perú. 2000. Capítulo 11, p 266.
 - Palomino H, Tabacchi L, Avila E, Eli O. Ensayo preliminar de transferencia de embriones en camélidos Sud Americanos. *Rev. Camélidos Sud Am. (Perú)* 1987; 5: 10-17.
 - Ratto MH, Gatica R, Correa JE. Timing of mating and ovarian response in llamas (*Lama glama*) treated with pFSH. *Anim. Reprod. Sci.* 1997; 48: 325-330.
 - Ratto MH, Singh J, Huanca W, Adams GP. Ovarian follicular wave synchronization and pregnancy rate after fixed-time natural mating in llamas. *Theriogenology* 2003; 60: 1645-1656.
 - Ratto M, Berland M, Huanca W, Singh J, Adams GP. *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes. *Theriogenology* 2005; 63: 2445-2457.
 - Ratto MH, Adams GP. Embryo Technologies in South American Camelids, in: Youngquist, R. S., Threlfall, W.R. (Eds.), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology 2*. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, 2006; pp. 900-905.

- Ratto M, Gómez C, Berland M, Adams GP. Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Anim. Reprod. Sci.* 2007; 97: 246-256.
- Sansinena RJ, Taylor SA, Taylor PJ, Denniston RS, Godke RA. Production of nuclear transfer llama (*Lama glama*) embryos from in vitro matured llama oocytes. *Cloning Stem Cells* 2003; 5: 191-198.
- Sansinena RJ, Taylor SA, Taylor PJ, Schmidt EE, Denniston RS, Godke RA. *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 2007; 99: 342-353.
- Sumar J, Franco E. Informe Final IVITA-La Raya. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. 1974.
- Trasorras V, Chaves MG, Miragaya MH, Pinto M, Rutter B, Flores M, Agüero A. Effect of eCG superstimulation and Buserelin in cumulus-oocytes complexes recovery and maturation in llamas (*Lama glama*). *Reprod. Dom. Anim.* 2009; 44: 359-364.
- Trasorras V, Chaves MG, Neild D, Gambarotta M, Aba M, Agüero A. Embryo transfer technique: Factors affecting the viability of the corpus luteum in llamas. *Anim. Reprod. Sci.* 2010; 121: 279-285.
- Tylor S, Taylor PJ, James AN, Godke RA. Successful commercial embryo transfer in the llama (*Lama glama*). *Theriogenology* 2000; 53: 344 (Abstract).
- Taylor PJ, Taylor S, James AN, Denniston RS, Godke RA. Alpaca offspring born after cross species embryo transfer to llama recipients. *Theriogenology* 2001; 55: 401 (Abstract).
- Velásquez C, Novoa MC. Superovulación con PMSG aplicada en fase folicular y fase luteal en alpacas. *Rev. Invest. Vet. (Perú)* 1999; 10 (1).
- Wiepz DW, Chapman RJ. Non-surgical embryo transfer and live birth in a llama. *Theriogenology* 1985; 24: 251-257.