

## PRODUCCIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES *in vitro* EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS: NUEVAS OPORTUNIDADES Y DESAFIOS

### *In vitro* production and transfer of embryos in South American Camelids: New opportunities and challenges

Jaime Ruiz Bejar

Laboratorio de Biotecnologías  
Reproductivas. Universidad  
Nacional de Huancavelica, Perú.

\* Corresponding author:  
Jaime Ruiz  
E-mail: [jaime.ruiz@unh.edu.pe](mailto:jaime.ruiz@unh.edu.pe)

#### ABSTRACT

Many of the studies on *in vitro* fertilization in South American camelids has culminated in the evaluation of the development to blastocyst. Initially work has been done with gametes collected from post-mortem animal, but recent work is already reporting the recovery of gametes from live females and males. Pregnancies have been achieved with *in vitro* embryos in alpacas and llamas, with gametes recovered from post-mortem animals and with gametes collected from living animals on llamas, the semen was collected by electroejaculation and the oocytes were aspirated from the ovaries exposed by laparotomy. Likewise, the birth of a male llama of gametes recovered from post-mortem animals has been achieved. However, further studies are needed to improve the efficiency of this biotechnology, standardize follicular aspiration protocols guided by ultrasonography, synchronism between the embryo and the recipient, train technicians trained in embryo transfer in camelids, overcoming these issues no doubt that the results of pregnancy and birth will improve by applying this biotechnology in South American camelids.

**Keywords:** *In vitro* fertilization, embryo transfer, alpacas, llamas.

#### RESUMEN

La mayoría de los trabajos sobre fecundación *in vitro* en camélidos sudamericanos han culminado en la evaluación del desarrollo hasta blastocisto. Inicialmente se han realizado trabajos con gametos recolectados de animales post mortem, pero los recientes trabajos ya están reportando la recuperación de gametos de hembras y machos vivos. Se han logrado preñeces con embriones *in vitro* en alpacas y llamas, con gametos recuperados de animales post mortem y también con gametos colectados de animales vivos en llamas, el semen se colectó por electroeyaculación y los ovocitos aspirados de ovarios expuestos por laparotomía. Asimismo, se ha logrado el nacimiento de una cría llama macho de gametos recuperados de animales post mortem. Sin embargo, es necesario mayores estudios para mejorar la eficiencia de esta biotecnología, estandarizar protocolos de aspiración folicular guiada por ultrasonografía, sincronismo entre el embrión y la receptora, formar técnicos capacitados en transferencia de embriones en camélidos, superando estos temas sin duda que los resultados de preñez y natalidad van a mejorar aplicando esta biotecnología en camélidos sudamericanos.

**Palabras claves:** Fecundación *in vitro*, transferencia de embriones, alpacas, llamas.

## INTRODUCCION

La fecundación *in vitro* (FIV) es el procedimiento por medio del cual ovocitos maduros son cultivados junto con espermatozoides y de esta forma fecundados, para esto los espermatozoides deben ser sometidos previamente a un proceso de preparación *in vitro* con el objetivo de iniciar su capacitación y desencadenar la reacción acrosómica (Palma 2001). La aplicación de protocolos de ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET) es bastante exitosa en bovinos con aplicación comercial en países con ganadería avanzada y en creciente desarrollo en nuestro país. En camélidos sudamericanos domésticos en cambio, la respuesta ovárica a tratamientos de ovulación múltiple es ampliamente variable (Miragaya et al., 2006) con una baja tasa de recuperación de embriones (Bourke et al., 1995).

Por lo tanto, el desarrollo de un sistema de producción *in vitro* de embriones podría solucionar en parte, alguno de estos problemas asociados con la MOET en camélidos sudamericanos. Sin embargo, el éxito de esta biotecnología está supeditada a la colección y maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos, condiciones de cultivo de los embriones y sincronización del embrión producido *in vitro* con la receptora para obtener mejores tasas de preñez con la transferencia de estos embriones. Existen desde hace varios años, trabajos de investigación en la producción de embriones por FIV en camélidos sudamericanos (Del Campo et al., 1994; Conde et al., 2008; Gamarra et al., 2008; Mellisho et al., 2014; Ruiz et al., 2017). Asimismo, se han reportado gestaciones tempranas en llamas (Mendoza et al., 2013; Trasorras et al., 2014) y alpacas (Mendoza et al., 2013), y el nacimiento de la primera llama en el mundo (Landeo et al., 2016a) con la aplicación de esta biotecnología. Sin embargo, son necesarios mayores estudios para mejorar las tasas de preñez y de natalidad que permitan a mediano y largo plazo introducir esta biotecnología en los sistemas de producción de alpacas y llamas. Por otro lado, el éxito de la transferencia de embriones de alpaca o llama producidos por fecundación *in vitro* permitiría tener más de una cría al año de una alpaca o llama hembra sobresaliente en el hato. Si además sabemos que las hembras de los camélidos tienen el limitante de producir menos de 6 crías durante toda su vida reproductiva, podríamos en el futuro obtener más crías/año de alpacas hembras donantes de ovocitos y así maximizar el número de crías por alpaca donadora, de esta manera contribuir al mejoramiento genético en esta especie.

### Producción de embriones en Camélidos Sudamericanos

Los primeros trabajos de investigación en la producción de embriones por FIV en camélidos sudamericanos se han realizado utilizando gametos recuperados de animales beneficiados (Del Campo et al., 1994; Gamarra et al., 2008; Mendoza et al., 2008). Estos trabajos han sido de valiosa ayuda para investigar en estandarizar protocolos de MIV y FIV. Sin embargo, para el mejoramiento genético es necesario recuperar los complejos ovocito-cúmulo (COCs) de camélidos sudamericanos utilizando la técnica de aspiración transvaginal guiada por ultrasonografía, seleccionarlos y fertilizarlos *in vitro* con espermatozoides de los mejores machos. Por otro lado, existen pocos reportes sobre el uso de esta técnica para la recuperación de COCs en llamas (Brogliatti et al., 2000) y en alpacas (Huanca et al., 2006; Gamarra et al., 2007), realizándose únicamente evaluaciones cuantitativas y cualitativas de los COCs recuperados y como no fueron fecundados no se presentó información sobre la competencia del desarrollo *in vitro* de los ovocitos de alpacas y llamas. En posteriores estudios, COCs de llama recuperados por

aspiración transvaginal fueron fecundados por ICSI (intracytoplasmic sperm injection) obteniendo 12% de blastocistos (Sansinena et al., 2007) y por FIV obteniendo 22% de blastocistos (Berland et al., 2011), sin embargo en ninguno de los estudios los embriones fueron transferidos, de este modo el reto pendiente para los investigadores peruanos es la fecundación *in vitro* de ovocitos de alpaca recuperados por aspiración transvaginal guiada por ultrasonografía, su cultivo *in vitro* y transferencia en receptoras sincronizadas.

Con respecto a la MIV de COCs de llamas, Del campo et al. (1992) evaluaron 36 horas de MIV y obtuvieron 62% de ovocitos en MII (Metafase II) y Del Campo et al. (1994), obtuvieron 30% de ovocitos en MII luego de 30 horas de MIV. Miragaya et al. (2002), evaluaron 27-30 horas para la MIV de COCs de llama y obtuvieron alrededor de 70% de ovocitos en MII. En un estudio similar, Ratto et al. (2005), encontraron 77,7%, 80,6% y 80,4% de ovocitos en MII posterior a las 28, 30 y 36 horas de MIV, sin diferencias significativas entre los tiempos de maduración evaluados y que 28 horas sería el tiempo óptimo de MIV de COCs de llama. Posteriormente, Ayuque et al., (2014) determinaron el tiempo óptimo de maduración nuclear de ovocitos en el desarrollo de embriones producidos por FIV, para ello maduraron *in vitro* COCs de llama por espacio de 28, 36 y 42 horas. Los resultados obtenidos muestran que el mayor porcentaje de ovocitos en metafase II está entre 36 y 42 horas con 70,2% y 70,5 respectivamente, seguido de 28 horas con 49,1%. En cuanto a los resultados del desarrollo embrionario, obtuvieron porcentajes de segmentación, mórula y blastocistos de 51,0%, 71,5% y 11,6% respectivamente para 36 horas y los porcentajes de segmentación, mórula y blastocistos de 49,6%, 76,7% y 12,5% respectivamente para 42 horas. Concluyendo que el tiempo óptimo que requiere los ovocitos de llama para llegar a la madurez nuclear (metafase II) se encuentra entre 36 y 42 horas.

También se han producido embriones *in vitro* en llamas utilizando gametos obtenidos de animales vivos (Conde et al., 2008; Machicado et al., 2009) en ningún de estos trabajos se han reportado la transferencia de los embriones. Por otro lado, Trasorras et al. (2014), fertilizaron COCs de llama recuperados por laparatomía 20 horas después de la inducción de la ovulación para lo cual utilizaron 8 ug de buserelina. La inducción de la ovulación se hizo 5 días después del inicio del tratamiento superovulatorio, el cual se realizó con 1500 UI de eCG, en llamas donantes que mostraron folículos menores a 5 mm en la evaluación ecográfica. Los COCs fueron fecundados con espermatozoides de llama recuperados por electroeyaculación. La transferencia de embriones se realizó 6 días después de la aplicación de Buserelina. 23 días después de la transferencia de embriones se observó preñez en una de las receptoras y a los 42 días se perdió la misma. Hasta la fecha, no existen reportes de producción de embriones *in vitro* de alpacas con gametos obtenidos de animales vivos.

### Aporte de la Universidad Nacional de Huancavelica

En el laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica se producen embriones *in vitro* ininterrumpidamente desde el año 2007. Es sin duda el laboratorio en el Mundo en donde más tiempo se ha dedicado a trabajar en estandarizar protocolos de MIV y FIV en camélidos sudamericanos. En nuestra primera experiencia fecundando ovocitos de alpaca comparamos los métodos de gradiente de Percoll y Swim up (Mendoza et al., 2008) para la recuperación y separación de espermatozoides epididimarios. Todos los reportes de fecundación *in vitro* en

camélidos sudamericanos se han realizado utilizando el método de gradiente de Percoll. Sin embargo, en algunas especies el método de swim up resultó mejor que el método de gradiente de Percoll. En cabras (Hernández et al., 2015), encontraron mejor porcentaje de motilidad progresiva ( $56,1 \pm 11,3$  vs  $30,5 \pm 9,6$ ) y mejor porcentaje de espermatozoides vivos con reacción acrosomal ( $51,7 \pm 10,6$  vs  $41,2 \pm 12,0$ ) cuando utilizaron swim up comparado con gradiente de Percoll, contrariamente Guerin et al., (1989) encontraron que la capacidad de fecundación *in vitro* fue superior en los espermatozoides separados con gradiente de Percoll aumentando la tasa de gestación, asimismo Akerlof et al., (1987) encontraron que con gradiente de Percoll se seleccionan espermatozoides con una motilidad progresiva significativamente superior que mediante swim up. Los resultados obtenidos por Mendoza et al., (2008) fueron 36,0% y 43,9% de división (embriones de 2-4 células) a las 48 horas de cultivo *in vitro* y 6,3% y 6,9% de blastocistos a los 8 días para Percoll y Swim up respectivamente, sin diferencias significativas. Recientemente (Ruiz et al., 2017), mejoramos las tasas de división (65,5% y 67,0% con swim up y gradiente de Percoll respectivamente) y de blastocistos (26,5% y 28,6% con swim up y gradiente de Percoll respectivamente) obtenidas por Mendoza et al. (2008), pero igualmente no encontramos diferencias estadísticas entre ambas técnicas. Además, el uso de Percoll incrementa los costos de la FIV comparado con el swim up, por estos motivos nosotros siempre hemos usado el método de swim up para la recuperación y separación de espermatozoides.

Para el cultivo de embriones se utilizan fases gaseosas compuestas por 5% de CO<sub>2</sub> y una mezcla de gases conformada por 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. Dinnyes et al. (2000), obtuvieron en bovinos similares tasas de segmentación con ambas atmósferas de cultivo. Sin embargo, las tasas de blastocistos fueron superiores con la mezcla de gases conformada por 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. En ambos casos las concentraciones son similares a las encontradas en el oviducto de algunas mamíferas (Mucci et al. 2006). Por estos motivos en nuestro laboratorio (Huamán et al., 2011) evaluamos el efecto de estas dos atmósferas de cultivo en el desarrollo *in vitro* de embriones de alpaca. Los resultados obtenidos fueron: 86,4%, 78,3% y 10,0% en una atmósfera de 5% O<sub>2</sub> y 91,3%, 86,1% y 11,2% en una atmósfera con 90% N<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, para división, mórula y blastocistos respectivamente. El desarrollo de embriones de alpaca producidos por fecundación *in vitro* fue similar utilizando 5% CO<sub>2</sub> o 90% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y 5% O<sub>2</sub>. Desde entonces usamos solamente CO<sub>2</sub> para maduración y cultivo de embriones *in vitro*.

Por otro lado, en la MIV de ovocitos de alpaca se han utilizado diferentes tiempos tales como: 24-26 horas (Ratto et al., 2007; Ruiz et al., 2007; Mendoza et al., 2008; Huamán et al., 2011), 27 horas (Ruiz y Correa 2007) y 30 horas (Gamarrá et al., 2008). Sin embargo, Huanca et al. (2009), indican que son necesarias más de 38 horas para la MIV y Santayana et al. (2012), realizaron un estudio con el objetivo de determinar el tiempo óptimo (24, 28 y 32 horas) de maduración nuclear *in vitro* de ovocitos de alpaca y evaluar la influencia de este sobre el desarrollo embrionario luego de la FIV. Los resultados obtenidos muestran que el mayor porcentaje de maduración nuclear (ovocitos en Metafase II) fue alcanzado a las 32 horas de cultivo *in vitro* con un 65,1%, seguido por el de 28 horas con un 50,3% y finalmente el de 24 horas con un 46,3%. En cuanto al desarrollo embrionario, se observó que los porcentajes de segmentación y blastocisto aumentaron gradualmente hacia el mayor tiempo de maduración, siendo el de 32 horas el tiempo con el mayor índice de desarrollo

alcanzado, con un 60,2% y 17,0% en comparación con 47,5% y 14,2% para 28 horas y 41,6% y 11,0% para 24 horas, para los estadios de segmentación y blastocisto respectivamente. Concluyendo que el tiempo óptimo para la maduración nuclear y la adquisición máxima de la capacidad de desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos de alpaca, fue de 32 horas. Los reportes de Huanca et al. (2009) y Santayana et al. (2012) indicarían que en alpacas a mayor tiempo de MIV se obtienen mayores tasas de embriones. Sin embargo, en recientes estudios (Landeo et al., 2016b) han encontrado una mayor tasa de maduración de ovocitos de alpaca a las 42 horas, comparado con 26, 30, 34 y 38 horas, resultados que concuerdan en parte con los reportes de Huanca et al. (2009) y Santayana et al. (2012). Sin embargo, cuando fecundaron los COCs con los mismos tiempos de MIV se obtuvo una mayor tasa de blastocistos a las 26 horas y una menor tasa a las 42 horas de MIV, esto parece razonable porque a las 42 horas los ovocitos que llegaron a metafase II tempranamente ya están envejecidos y cuando se los fertiliza a las 42 horas se obtiene menos desarrollo *in vitro* y por lo tanto menos blastocistos.

El uso del semen congelado es un aspecto limitante para la masificación de la inseminación artificial en camélidos sudamericanos. Sin embargo, en la producción *in vitro* de embriones se han fertilizado ovocitos de alpaca con semen congelado (Gamarrá et al., 2008), pero las tasas de blastocistos obtenidas han sido menores a las reportadas con semen fresco (Ruiz et al., 2017). El uso del semen refrigerado se ha presentado como una alternativa para conservar y trasladar el semen para la inseminación artificial de alpacas y llamas. La fertilidad del semen refrigerado puede evaluarse fertilizando ovocitos obtenidos de ovarios de camal, por tales motivos Ramos et al. (2015) evaluaron la capacidad fecundante de espermatozoides refrigerados en la producción de embriones *in vitro* de alpaca. Para cumplir con este objetivo, los espermatozoides se diluyeron en TRIS y se evaluaron muestras de espermatozoides refrigerados a 5°C por 0, 4 y 8 horas. Para 0 horas se obtuvo una vitalidad de 78% y una motilidad de 80%; para 4 horas se obtuvo una vitalidad de 64% y una motilidad de 71%; para 8 horas se obtuvo una vitalidad de 60% y una motilidad de 62%. Con respecto a la FIV los resultados obtenidos fueron: Segmentación para 0 horas 48,0%  $\pm$  3,00, para 4 horas 45,10%  $\pm$  9,09, para 8 horas 45,57%  $\pm$  7,75; para mórula fueron: para 0 horas 67,69%  $\pm$  8,94, para 4 horas 55,81%  $\pm$  12,20, para 8 horas 52,99%  $\pm$  15,06; y para blastocisto fueron: para 0 horas 20,67%  $\pm$  4,24, para 4 horas 19,62%  $\pm$  5,76, para 8 horas 19,13%  $\pm$  7,68. Concluyendo que conforme aumenta el tiempo de refrigeración de los espermatozoides de alpaca el porcentaje de producción de embriones por fecundación *in vitro* disminuye.

A medida que avanzábamos con los trabajos de fecundación *in vitro* en alpacas obteníamos embriones de mejor calidad, lo que nos incentivó a iniciar las transferencias de estos en receptoras. En general nos fue mejor con receptoras llamas que con alpacas, y también inicialmente muchas transferencias no generaron preñeces, hasta que Mendoza et al. (2013), reportaron el logro de las primeras gestaciones del mundo en alpacas y llamas con embriones producidos por fecundación *in vitro*. En esta oportunidad seleccionamos 3 alpacas y 5 llamas como receptoras, las cuales fueron sincronizadas con CIDR por 7 días y 5 días después del retiro de CIDR se aplicó GnRH para inducir ovulación previa detección ecográfica de un folículo dominante de 7 mm. La inseminación *in vitro* de los ovocitos se realizó el día de la inducción de la ovulación de las receptoras. La transferencia de los embriones se realizó 8 días después de la fecundación *in vitro* en el cuerno uterino

ipsilateral al ovario que presentaba un cuerpo lúteo de buena calidad. 45 días después se comprobó ecográficamente que se obtuvo 1 alpaca (33%) y 3 llamas (60%) preñadas. Estos resultados nos incentivaron a continuar con la transferencia de embriones (Landeo et al., 2016a), entonces realizamos 15 transferencias de embriones producidos por FIV, en esta oportunidad todas las receptoras fueron llamas. Se transfirieron 9 embriones de alpacas y 6 embriones de llamas producidos por FIV, se obtuvieron tasas de preñez de 33.3% (3/9) y 50% (3/6) en llamas transferidas con embriones de alpaca y llama respectivamente; y tasa de nacimiento de 0.0% (0/9) y 16.7% (1/6) para embriones de alpaca y llama respectivamente. Un feto alpaca y dos fetos de llama fueron abortados entre los 7 y 10 meses de gestación, y solamente una llama logró terminar la gestación satisfactoriamente, produciéndose el primer nacimiento del Mundo de una cría llama por FIV en camélidos sudamericanos, demostrándose que es posible obtener crías vivas en estas especies usando esta biotecnología.

El co-cultivo es una técnica que podría favorecer el desarrollo del embrión ya que este provee de nutrientes y libera factores de crecimiento que podrían estimular el desarrollo *in vitro* hasta el estado de blastocito, es por este motivo que en nuestro laboratorio, (Manrique et al. 2016), evaluamos el efecto del co-cultivo con células de la granulosa sobre las tasas de desarrollo de embriones de alpaca producidos por fecundación *in vitro*. El cultivo de células de la granulosa fue obtenido a partir de la placa de maduración *in vitro* posterior a la MIV, donde aquellas células que habían formado monocapa fueron tripsinizadas por un periodo de 2 minutos y recuperados por centrifugación. Para el co-cultivo de células y embriones, se tomó una suspensión celular de 10 µl en medio SOF-IVC suplementado con 20% de suero fetal bovino y glucosa, posterior a las dos horas de cultivo, los supuestos embriones fueron transferidos a la placa que contenía células de la granulosa y mantenidos durante 7 días en la estufa de cultivo celular. Los tratamientos evaluados fueron, T1: con co-cultivo y T2: sin co-cultivo. Los resultados obtenidos fueron: para tasa de segmentación 31.6% y 33.2% para T1 y T2 respectivamente, para tasa de blastocistos 10.2% y 13.4% respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticas en ambas variables evaluadas. En conclusión, no existe efecto del co-cultivo con células de la granulosa sobre el desarrollo de embriones *in vitro* de alpaca. Sin embargo (Ruiz y Artica, 2016) encontraron que el co-cultivo de embriones de alpaca con fibroblastos, células fetales y células del oviducto se obtienen mejores tasas de división y de blastocistos que con células de la granulosa y sin co-cultivo.

Por otro lado, con la finalidad de incrementar las tasas de desarrollo embrionario se han explorado medios de cultivo de embriones como: SOFaa (Gamarrá et al., 2008), TCM 199 (Huanca et al., 2009), KSOM+SOF (Huanca et al., 2010; Condori et al., 2010) y SOFaa DMEM F12 (Trasorras et al., 2012). Sin embargo, los reportes de desarrollo embrionario han sido muy variables, Huanca et al. (2009) obtuvieron desarrollos hasta dos células; Ratto et al., (2007) reportaron desarrollo hasta mórula; Huanca et al. (2009) y Berland et al. (2011) hasta blastocisto; Gamarrá et al. (2008) hasta blastocisto eclosionado y Trasorras et al. (2012) hasta blastocisto expandido. Por este motivo, Landeo et al. (2017a) realizaron un estudio en nuestro laboratorio con el objetivo de identificar el medio adecuado para cultivar embriones de alpaca producidos por fecundación *in vitro*. Ovocitos de alpaca se seleccionaron y colocaron en medio de maduración por 26 horas y luego fueron colocados en FERT-TALP e inseminados con espermatozoides epididimarios que fueron recuperados en SPERM-TALP y capacitados durante 50 minutos

en FERT-TALP mediante la técnica de SWIM UP. Después de 18 horas de co-cultivo de espermatozoides y ovocitos, los embriones fueron cultivados en: TCM-199, SOF-IVC, CR1aa o KSOM. Los resultados para división fueron: 27,7%, 52,7%, 45,5% y 37,1% para TCM-199, SOF-IVC, CR1aa, y KSOM respectivamente. Para mórula fueron: 22,6%, 32,6%, 6,9% y 26,7% para TCM-199, SOF-IVC, CR1aa, y KSOM respectivamente. Para blastocisto fueron: 8,8%, 23,6%, 2,7% y 19,9% para TCM-199, SOF-IVC, CR1aa y KSOM respectivamente. Para blastocisto expandido los resultados fueron: 0,0%, 19,1%, 0,0% y 17,6% para TCM-199, SOF-IVC, CR1aa, y KSOM respectivamente. Para blastocisto eclosionado los resultados fueron: 0,0%, 13,6%, 0,0% y 11,8% para TCM-199, SOF-IVC, CR1aa, y KSOM respectivamente. Para división, mórula y blastocisto SOF-IVC y KSOM fueron superiores estadísticamente. No se encontró diferencias significativas entre SOF-IVC y KSOM para blastocistos expandidos y eclosionados. Los medios adecuados para el cultivo *in vitro* de embriones de alpaca son SOF IVC y KSOM.

El suero es uno de los componentes orgánicos más importante de los medios de cultivo y es ampliamente usado en los procesos de producción *in vitro* de embriones de mamíferos. Aporta factores de crecimiento, hormonas, minerales y lípidos, que, al ser usados en concentraciones apropiadas en el medio de cultivo, suplen satisfactoriamente los requerimientos metabólicos que garantizan los procesos de división meiótica durante la maduración y desarrollo embrionario. En la MIV de ovocitos de alpaca se utiliza Suero fetal bovino (SFB). Bajo esta perspectiva, en nuestro laboratorio (Landeo et al., 2017b) evaluamos el uso del suero fetal de alpaca (SFALP) a diferentes concentraciones sobre la maduración *in vitro* de ovocitos de alpacas. Un total de 407 complejos ovocitos cumulus (COCs) fueron recuperados de ovarios de faena, mediante aspiración folicular. Para la MIV estos fueron distribuidos en 4 grupos: grupo I (G1: madurados en TCM 199 + 10% SFALP), grupo II (G2: madurados en TCM 199 + 15% SFALP), Grupo III (G3: madurados en TCM 199 + 20% SFALP) y grupo control (GC: madurados en TCM 199 + 10% SFB), mantenidos en una cámara de cultivo con 5% CO<sub>2</sub> y 99% de humedad relativa a 38,5°C, por 26 horas. Los resultados obtenidos fueron: para vesícula germinal 7,7%, 2,1%, 9,1% y 17,4% para G1, GII, GIII y GC respectivamente. Para Vesícula Germinal Rota 1,1%, 8,1%, 3,5% y 17,4% para G1, GII, GIII y GC respectivamente. Para Metafase I: 44,0, 27,4, 44,6 y 27,5% para para G1, GII, GIII y GC respectivamente. Para Metafase II: 35,2, 32,4, 35,9 y 17,1 para G1, GII, GIII y GC respectivamente. En conclusión, la suplementación del medio TCM 199 con SFALP al 10, 15 y 20% incrementan las tasas de ovocitos en MII después de 26 horas de maduración *in vitro*.

En nuestro laboratorio también se han producido embriones por bipartición, la llamada clonación embrionaria para producir gemelos idénticos. Para ello, Landeo et al. (2017c) evaluaron la competencia de desarrollo de embriones FIV de alpaca producidos por bisección embrionaria. 33 embriones de calidad buena y excelente en diferentes estados: de dos células (n=6), de 8 células (n=15) y mórulas (n=12) producidos por FIV fueron bipartidos obteniéndose dos mitades relativamente iguales. Estos embriones fueron tratados con proteasa durante dos minutos para remover la zona pelúcida y luego cortados con ayuda de una cuchilla microquirúrgica. Obtuvimos 66 demi-embriónes después de la bisección embrionaria y todos fueron cultivados *in vitro*. 25% (3/12) de embriones bipartidos en dos células y 100% (30/30) de aquellos embriones bipartidos en 8 células desarrollaron hasta el estado de mórula; y 80% (18/24) de embriones bipartidos en el estado de mórula desarrollaron hasta el estado de blastocisto. En el grupo control de embriones no manipulados

nosotros obtuvimos 42% (25/60), 35% (21/60), 32% (19/60) y 28% (17/60) de división, mórula, blastocisto y blastocisto eclosionado respectivamente. En conclusión, embriones de alpacas clonados por bipartición en estados menores a 8 células no producen blastocistos. La etapa más temprana para producir blastocistos a partir de embriones de alpaca producidos por bisección embrionaria es la etapa de mórula.

En las especies domésticas de interés productivo, especies silvestres y en medicina humana, el interés en la preservación por frío de ovocitos ha aumentado por la creciente importancia de la producción de embriones *in vitro*, de la transferencia nuclear y del almacenamiento de material genético en los bancos de germoplasma. Además, el corto tiempo que un ovocito permanece viable y el limitado número que puede ser colectado, hacen que el éxito de la preservación de ovocitos sea de gran interés para la investigación básica y la aplicación comercial (Albarracín y col., 2005). Por estos motivos Landeo (2018) se planteó el objetivo de producir blastocistos de alpaca mediante FIV a partir de complejo ovocito cúmulus (COCs) vitrificados por dos técnicas: Cryotech® y Microgotas. Para lo cual 1094 COCs de categoría I y II fueron recuperados de ovarios de matadero, y madurados *in vitro* por 36 horas. Posterior a la maduración *in vitro* los COCs fueron aleatoriamente distribuidos en tres grupos, vitrificados: VM (n=250) y VC (n=244), expuestos: EM (n=200) y EC (n=200) y no vitrificado y sin exponer NVE (n=200). La FIV fue realizada 24 horas después de la criopreservación de los COCs utilizando espermatozoides epididimarios. Las tasas de división celular y mórulas obtenidas a partir de ovocitos vitrificados con Cryotech® (VC) y Microgotas (VM) fueron (16,8 y 12,5%) y (13,5 y 8,25%) respectivamente y no evidenciaron diferencias estadísticas significativas entre ambos. Y las tasas de división celular y mórulas (41,5 y 34,5%) obtenidas a partir de COCs expuestos a Cryotech® (EC) fueron similares a las tasas de división celular y mórulas (61,3 y 50%) obtenidas a partir de COCs NVE. Las tasas de blastocistos tempranos (4,5; 10,3 y 4,0%) obtenidos a partir de COCs VM, VC y EM fueron significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) que las tasas de blastocistos tempranos (23,8 y 27,3%) obtenidos a partir de COCs EC y NVE respectivamente. Las tasas de blastocistos expandidos (20,5 y 21,8%) obtenidos a partir de COCs EC y NVE respectivamente fueron significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) que las tasas de blastocistos expandidos (1,5%) obtenidos a partir de COCs EM. Los COCs vitrificados con VM y VC no alcanzaron a desarrollar hasta el estadio de blastocistos expandidos ni eclosionados. Las tasas de blastocistos eclosionados (0,45, 9,9 y 21,1%) obtenidos a partir de COCs EM, EC y NVE respectivamente fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). En conclusión, es posible obtener desarrollo hasta blastocistos tempranos a partir de COCs vitrificados, y con Cryotech® se obtienen mayores porcentajes de desarrollo a blastocistos tempranos que con Microgotas. Este es el primer trabajo de producción de embriones FIV de alpacas a partir de ovocitos criopreservados por vitrificación.

#### Desafíos en la FIV en camélidos sudamericanos

Como indicamos en otras secciones de este artículo, esta técnica debe estar disponible en los sistemas de producción de alpacas y llamas, para lograr mayor avance genético en estas especies. Para ello el primer desafío es el de recuperar los ovocitos, para ello es necesario protocolos para donantes sometidas a aspiración folicular y también es necesario especialistas en OPU en camélidos, si son escasos para OPU en vacunos el problema es mucho más serio en camélidos, lo cual está involucrado con el equipamiento que es caro y no existe un sistema OPU para camélidos ya que mayormente se

adaptan equipos que se utilizan para aspirar foliculos de mujeres. La recuperación de ovocitos por laparoscopia puede ser otra alternativa que necesita ser evaluada y validada. Una vez solucionado el tema de disponibilidad de ovocitos, la producción de embriones *in vitro* va a ser una realidad teniendo en cuenta que ya existe buena experiencia en producir embriones *in vitro* con ovocitos aspirados de ovarios de camal.

Falta desarrollar protocolos para sincronizar receptoras con el embrión producido *in vitro*, la receptora debe estar en sincronismo con el estadio del embrión (mórula compacta, blastocisto, blastocisto expandido o blastocisto eclosionado) que se va a transferir. Además, no se sabe cuál es el estadio más adecuado para transferir un embrión *in vitro* de camélidos. Del mismo modo, es muy importante seleccionar en forma adecuada a las receptoras, el hecho de que una hembra este vacía no significa que va a ser una buena receptora, obtener un embrión *in vitro* cuesta mucho trabajo y dedicación para echarlo a perder por una mala selección de la receptora, lo cual suele ser uno de los fracasos de los programas de transferencia de embriones. El historial ginecológico es muy importante, su performance como madres también se debe tener en cuenta, madres que tengan facilidad para preñar, libres de enfermedades reproductivas.

Es necesario entrenar y formar transferencistas de embriones. El transferencista debe colocar el embrión en el útero lo más pronto posible, sin estresar al animal y sin causar daño a la pared uterina. El útero de la alpaca es muy pequeño, por lo que es necesario investigar cuál sería el lugar más indicado para dejar el embrión, en vacunos se busca dejar el embrión lo más profundo posible, pero es una especie en que el útero es más fácil de manipular comparado con el de la alpaca.

Si solucionamos estos 3 aspectos: obtención de ovocitos, sincronía embrión-receptora y transferencistas entrenados, se habrá avanzado bastante en el dominio de esta biotecnología reproductiva, claro que hay otros aspectos como la disponibilidad de semen congelado por ejemplo, que se deben solucionar, sería más fácil el trabajo en el laboratorio para la fecundación de los ovocitos si se dispone de pajillas congeladas, sino la fecundación va estar condicionada a la colección del semen para lo cual necesitamos preparar toda una logística y atrasar el trabajo ya que dependería de la duración de la monta en el maniquí y si logra el macho eyacular espermatozoides vivos. En la medida en que se solucionen estos aspectos, la fecundación *in vitro* en camélidos sudamericanos será una realidad y un gran aporte cuando empiecen a nacer muchas crías por esta biotecnología.

#### CONCLUSIONES

Si bien se han logrado gestaciones de alpacas y llamas, asimismo el nacimiento de una cría llama producto de la transferencia de un embrión *in vitro*, son necesarios mayores estudios para estandarizar la técnica de producción *in vitro* de embriones en alpacas y llamas. Es necesario establecer protocolos para la aspiración folicular guiada por ultrasonido en alpacas y llamas, lograr la sincronía de la receptora y el estadio del embrión a transferir, formación de transferencistas de embriones de camélidos sudamericanos.

## REFERENCIAS

- Akerlof E, Fredicson B, Gustafsson O, Lundin A, Lunell NO, Nylund L, Rosenborg L, Pousette A. Comparison Between a swim up and a percoll gradient technique for the separation of human spermatozoa. *Int J Androl* 1987; 10 663 - 669.
- Albarracín J, Morató R, Rojas C, Mogas T. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of *in vitro* matured prepubertal and adult bovine oocytes, *Theriogenology*. 2005; 63: 890-901.
- Ayuque A, Justiniano E, Mendoza J, Landeo L, Ruiz J. Efecto del tiempo de maduración *in vitro* en la capacidad meiótica y desarrollo de embriones de llama. *SPERMOVA*. 2014; 4(1): 99 – 101.
- Berland M, Von Baer A, Ruiz J, Parraguez V, Ratto M. *In vitro* fertilization and development of cumulus oocytes complexes collected by ultrasound-guided follicle aspiration in superstimulated llamas. *Theriogenology*. 2011; 75: 1482–1488.
- Bourke DA, Kyle CE, Mc Evoy TG, Young P, Adam CL. Superovulatory responses to eCG in lamas (*Lama glama*). *Theriogenology*, 1995; 44: 255 – 268.
- Brogliatti GM, Palasz AT, Rodriguez-Martinez H, Mapletoff RJ, Adams GP. Transvaginal collection and ultrastructure of llama (*Lama glama*) oocytes. *Theriogenology*, 2000; 54: 1269-1279.
- Conde PA, Herrera C, Trasorras VL, Giuliano S, Director A, Miragaya MH, Chaves MG, Carchi 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. *Animal Reproduction Science*. 2008; 109, 298 – 308.
- Del Campo M, Del Campo C, Donoso M, Berland M, Mapletoff R. *In vitro* fertilization and development of Lama glama oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology*. 1994; 41: 1219-1229.
- Del Campo MR, Donoso MX, Del Campo CH. et al. *In vitro* maturation of Llama (*Lama glama*) oocytes. *Proc 12th Int Cong Anim Reprod*, 1992; 1:324.
- Dinnyés A, Dai Y, Jiang S, Yang X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction*. 2000; 63: 513-518.
- Gamarra G, Huamán E, León S, Carpio M, Alvarado E, Asparrin M, Vivanco W. First *in vitro* embryo production in alpacas (*Lama pacos*). *Reproduction, Fertility and Development*. 2008. 21: 177-178.
- Gamarra G, Gallegos A, Alvarado E, Asparrin M, Vivanco W. Techniques for ovum pick-up in gonadotropin treated alpacas. *Reproduction, Fertility and Development*. 2007; 20, 159–160.
- Guerin JF, Mathieu C, Lornage J, Pinatel MC, Bouliou D. Improvement of survival and fertilizing capacity of human spermatozoa in an IVF programme by selection on discontinuous Percoll gradients. *Hum Reprod*. 1989; 4:798 – 804.
- Hernández J, Rodríguez J, Sánchez C, Ramírez R. Efecto de técnicas de separación espermática en la viabilidad y estado acrosomal de espermatozoides posdescongelados de ovinos. *Rev Salud Anim*. 2015. 37:1.
- Huamán E, Tiellacuri F, Landeo L, Ruiz J. Efecto de la atmósfera de cultivo sobre el desarrollo de embriones de alpacas producidos por fecundación *in vitro*. XXXIV Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Trujillo – Perú. 2011.
- Huanca W, Condori R, Cainzos J, Chileno M, Quintela L, Becerra J, Herradon PG. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of alpaca (*Vicugna pacos*) oocytes: effect of time of incubation on nuclear maturation and cleavage. *Reproduction, Fertility and Development*, 2009; 22(1): 327–327.
- Huanca W, Ratto M, Vásquez M, Cervantes M, Cordero A, Enciso M, Huanca T, Adams G. Fertilización *In Vitro* En Camélidos, I: Recuperación de ovocitos vía transvaginal. *Memorias de la XXIX Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal*. Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo. Perú. 2006.
- Landeo L. Producción de embriones de alpacas por fecundación *in vitro* a partir de ovocitos vitrificados. Tesis para optar el título de Magister en Reproducción Animal. Universidad de Buenos Aires - Argentina. 2018.
- Landeo, L, Ramos Y, Artica M, Ruiz J. Efecto del medio de cultivo sobre el desarrollo de embriones *in vitro* de alpacas. XL Reunión Científica de la Asociación Peruana de Producción Animal. Chachapoyas. Perú. 2017a.
- Landeo L, Onofre Y, Monteverde L, Manrique L, Contreras FJ, Ruiz J. Uso de suero fetal de alpaca en la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca. X Congreso Latinoamericano de Especialistas en Rumiantes Menores y Camélidos Sudamericanos. ALEPRYCS. 2017b. Punta Arenas – Chile. Del 2 al 4 de mayo del 2017.
- Landeo L, Molina RS, Zúñiga ME, Gastelu TR, C. Sotacuro, J. Ruiz. *In vitro* development of alpaca embryos obtained by bisection. *Reproduction, Fertility and Development*, 2017c; 30(1):189-189.
- Landeo L, Mendoza J, Manrique L, Taipe E, Molina R, Contreras J, Ruiz J. First Llama born by *in vitro* fertilization. *Reproduction, Fertility and Development*, 2016a; 29(1): 188-188.
- Landeo L, Manrique L, Ramos Y, Contreras J, Artica M, Ruiz J. Evaluación del tiempo de maduración de ovocitos de alpaca (*vicugna pacos*) en la producción de embriones por fecundación *in vitro*. XXXIX Reunión Científica de la Asociación Peruana de Producción Animal. Lambayeque – Perú. 2016b.
- Machicado R, Delgado PA, Flores E. Descripción del proceso de fertilización *in vitro* de ovocitos de llama (*Lama glama*) obtenidos por superestimulación ovárica con eCG y fertilizados con semen tratado con proteasa. V Congreso Mundial sobre Camélidos. Riobamba, Ecuador. 2009.
- Mellisho E, Rivas V, Ruiz J, Mamani, G. Effect of sperm selection on the rate of *in vitro* fertilization in alpaca (*vicugna pacos*). *Reproduction, Fertility and Development* 2014; 27(1):217-218.
- Manrique L, Landeo L, Taype E, Contreras J and Ruiz J. Efecto del co-cultivo con células de la granulosa sobre el desarrollo de embriones de alpacas (*vicugna pacos*) producidos por fecundación *in vitro*. VI Congreso Peruano de Reproducción Animal – 2016, UCSM – Arequipa. 2016.
- Mendoza J, Landeo L, Yauri M, Manrique L, Molina R, Castañeda F, Contreras J, Ruiz J. Experiencias preliminares de gestación en alpacas y llamas con transferencia de embriones de alpacas producidos *in vitro*. XXXVI Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Lima – Perú. 2013.
- Mendoza J, Ayuque A, Triviño F, Ayuque G, Landeo L, Ruiz J. Evaluación de dos métodos de recuperación de espermatozoides epididimarios para la fecundación *in vitro* de ovocitos de alpaca. XXXI Reunión Científica de la Asociación Peruana de Producción Animal. Lima – Perú. 2008.

- Miragaya MH, Chaves MG, Agüero A. Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Ruminant Research*. 2006; 61: 299-310.
- Miragaya MH, Chaves MG, Capdevielle EF, Ferrer MS, Pinto M, Rutter B, Neild DM, Agüero A. *In vitro* maturation of llama (*Lama glama*) oocytes obtained surgically using follicle aspiration. *Theriogenology*. 2002; 57 (1): 731.
- Mucci N, Aller JF, Kaiser GG, Hozbor F, Alberio RH. Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Arch med vet*. 2006;38(2): 97-104.
- Palma GA. Producción *in vitro* de embriones. En Palma GA. Primera edición. *Biología de la Reproducción*. 2001. Pp 225-282. INTA Balcarce.
- Ramos M, Martínez E, Mendoza J, Landeo L, Ruiz J. Capacidad fecundante de espermatozoides refrigerados en la producción *in vitro* de embriones de alpacas (*Vicugna pacos*) Huacaya. VII Congreso Mundial de Camélidos. 2015. Puno. Perú.
- Ratto M, Gomez C, Berland M, Adams G. Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Anim. Reprod Sci*. 2007; 97: 246-256.
- Ratto M, Berland M, Huanca W, Singh J, Adams G. *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes. *Theriogenology*. 2005; 63: 2445-2457.
- Ruiz J, Santayana P, Mendoza J, Landeo L, Huamán E, Ticllacuri F, Mujica F, Silva M, Ratto M. Effect of oocyte maturation time, sperm selection method and oxygen tension on *in vitro* embryo development in alpacas. *Theriogenology*. 2017; 95: 127-132.
- Ruiz J, Artica M. Optimización de la fecundación *in vitro* para la conservación del material genético de las alpacas (*vicugna pacos*) de la comunidad campesina de Carhuanchó distrito de Pilpichaca Provincia de Huaytara Región Huancavelica. Informe Final. Proyecto FOCAM. Universidad Nacional de Huancavelica. 2016.
- Ruiz JA, Correa JE, Ayuque G, Landeo L, Yaranga M, Zacarias A. Producción *in vitro* de embriones partenogénéticos de alpaca y llama. I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú. 2007.
- Ruiz JA, Correa JE. Maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca y llama aspirados vía laparoscópica. I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú. 2007.
- Sansinena M, Taylos S, Taylor P, Schmidt E, Denniston R, Godke R. *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Animal Reproduction Science*. 2007;99: 342-353.
- Santayana P, Mendoza J, Landeo L, Mujica F, Ruiz J. Tiempo de maduración de ovocitos de alpaca en el desarrollo embrionario por fecundación *in vitro*. VI Congreso Mundial de Camélidos. Arica - Chile. 2012.
- Trasorras V, Castex CB, Alonso A, Giuliano S, Cruz RS, Arraztoa C, Chaves G, Rodríguez D, Neild D, Miragaya M. First llama (*Lama glama*) pregnancy obtained after *in vitro* fertilization and *in vitro* culture of gametes from live animals. *Animal Reproduction Science*. 2014; 148(1-2): 83-89.
- Trasorras V, Giuliano S, Chaves M, Baca Castex C, Carretero V, Negro A, Rodríguez D, Miragaya M. *In vitro* embryo production in llamas (*Lama glama*) from *in vivo* matured oocytes with raw semen processed with Androcoll-E using defined embryo culture media. *Reprod Domest Anim*. 2012; 47(4):562-7.