

Artículo original:

PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VIVO E IN VITRO EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

In vivo e in vitro embryo production in South American camelids

Trasorras, V.L.

PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VIVO

Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Email: vtrasorras@fvvet.uba.ar

Palabras Clave:

Camélidos, in vitro, embriones, producción

En los camélidos sudamericanos (CSA), la producción de embriones in vivo se puede realizar a partir de un folículo dominante presente en el ovario de la hembra donante o se puede inducir el crecimiento folicular múltiple para aumentar el número de embriones recuperados.

Manejo de las hembras donantes de embriones

Inhibición de la onda folicular.

Según Bourke *et al.* (1995) al implementar superestimulación ovárica es necesario comenzar el tratamiento hormonal en ausencia de folículos dominantes. Miragaya *et al.* (2006) observaron que iniciar el tratamiento en presencia de un folículo mayor a 5 mm induce el crecimiento de ese único folículo. Para lograr inhibir la dinámica ovárica, se han desarrollado varios protocolos basados en el efecto negativo de la progesterona sobre la actividad folicular (Aba *et al.*, 1995). Se puede utilizar una fase luteal natural (induciendo la ovulación) o reproduciendo la fase luteal artificialmente utilizando progesterona o progestágenos exógenos.

Superestimulación ovárica.

Las drogas más utilizadas en camélidos para inducir superestimulación ovárica son FSH y eCG, en forma individual o conjunta. Según Bravo *et al.* (1995) la aplicación de 500 y 1000 UI de eCG, en ausencia de folículos dominantes controlado por ultrasonografía, son las óptimas para la superestimulación en llamas y un incremento en la incidencia de folículos quísticos fue observado con dosis mayores (2000 UI). En un trabajo realizado por nuestro equipo, 500 UI de eCG no produjo superestimulación ovárica luego de la inhibición folicular con benzoato de estradiol y CIDR® (Trasorras *et al.*, 2009). Según nuestra experiencia, el tratamiento con 1000 y 1500 UI de eCG son efectivos en inducir crecimiento folicular múltiple, pero con la aplicación de 1500 UI es mayor la producción de folículos (Trasorras *et al.*, 2009; Carretero *et al.*, 2010).

Inducción de la ovulación.

El tiempo que media desde el día de la aplicación del tratamiento superestimulador hasta la detección de folículos dominantes varía entre 5 a 7 días. Las hembras donantes de embriones reciben servicio

al momento de presentar dos o más folículos dominantes junto con una única dosis de buserelina para maximizar la respuesta ovulatoria.

Recuperación embrionaria

La obtención de los embriones producidos in vivo se realiza mediante la técnica de lavaje uterino no quirúrgico vía transcervical con ayuda manual desde el recto. En la llama, luego de la administración de buserelina, la ovulación ocurre a las $28,6 \pm 0,36$ horas pos-inyección (Bourke *et al.*, 1992) y el embrión

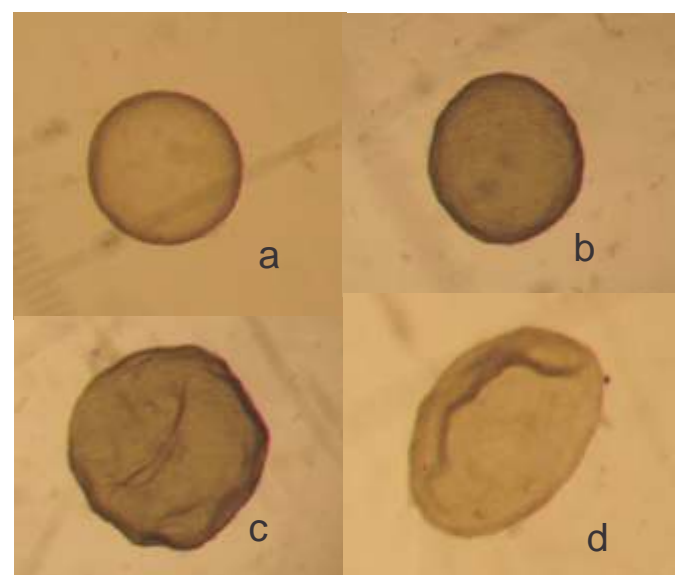


Figura 1. Cuatro diferentes grado 1 de embriones de llamas. a) embrión esférico y simétrico, b) embrión esférico con un pequeño contorno irregular, c) y d) embriones colapsados, comenzando el proceso de elongación.



PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO

La producción in vitro de embriones demanda una gran cantidad de ovocitos capaces de ser fertilizados, los cuales se pueden obtener a partir de ovarios provenientes de mataderos o de animales vivos.

Los dos métodos de obtención de ovocitos a partir de ovarios de mataderos utilizados en CSA son: disección de los folículos (alpacas: Condori *et al.*, 2010; Del Campo *et al.*, 1994) y aspiración de los folículos con aguja y jeringa (alpacas: Huanca *et al.*, 2009; llamas: Del Campo *et al.*, 1992; Ratto *et al.*, 2005).

La obtención de gametas provenientes de animales vivos ofrece la posibilidad de producir embriones de animales genéticamente superiores. La técnica con mayor porcentaje de recuperación de ovocitos en CSA es la aspiración de folículos vía laparotomía (más del 80%, llama: Trasorras *et al.*, 2009; alpaca: Gomez *et al.*, 2002; Ratto *et al.*, 2007; 55,4% en vicuña: Chaves *et al.*, 2003) (Figura 2). Otra técnica es la punción vía transvaginal con guía ultrasonográfica pero el porcentaje de COC's recuperados varía entre 52% (Brogliatti *et al.*, 2000), 74% (Ratto *et al.*, 2002) y 77% (Berland *et al.*, 2011) en hembras superestimuladas.



Figura 2. Aspiración folicular vía laparotomía en llama (ARRIBA) y vicuña (ABAJO) luego del tratamiento de superestimulación



Fertilización in vitro e inyección intracitoplasmática de un espermatozoide

Existen pocas publicaciones sobre fertilización in vitro (FIV) en camélidos. La primera FIV en llamas fue realizada por Del Campo *et al.* en 1994; de los 234 supuestos cigotos puestos a cultivar, sólo el 4,7 % (11/234) desarrolló hasta el estadio de blastocisto eclosionado. Gomez *et al.* (2002) reportaron la primera producción de embriones cruce alpaca-llama mediante FIV heteróloga; luego de 6 días de cultivo todos (n=5) llegaron hasta mórula, pero ninguno continuó con el desarrollo. Estos investigadores repitieron la producción de embriones cruce alpaca-llama pero obtuvieron el mismo estadio embrionario luego de 7 días de cultivo (Ratto *et al.*, 2007). Gamarra *et al.* (2008) lograron obtener blastocistos eclosionados de alpaca (1%, 3/262) mediante FIV a partir de ovocitos de matadero y espermatozoides de epidídimo congelado. Nuestro grupo también ha trabajado en la producción in vitro de embriones de llama mediante dos técnicas de fertilización asistida: inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI) (Miragaya *et al.*, 2003; Conde *et al.*, 2008) y FIV (Conde *et al.*, 2008; Trasorras *et al.*, 2011). El trabajo realizado por Conde *et al.* (2008) es el primero en obtener embriones de llama producidos in vitro por FIV e ICSI que desarrollaron hasta el estadio de blastocisto expandido utilizando gametos de animales vivos (Figura 3). Además, recientemente en nuestro laboratorio obtuvimos un 9% de blastocistos eclosionados mediante FIV (Trasorras *et al.*, 2011). El primer trabajo en aplicar ICSI en llamas fue realizado por Miragaya *et al.* (2003) utilizando animales vivos y Sansinena *et al.* (2007) demostraron que la activación química de los ovocitos luego de la ICSI mejora el desarrollo embrionario in vitro.

Cultivo embrionario in vitro

Las posibles técnicas de cultivo in vitro de embriones son: co-cultivo con diferentes tipos de células o el uso de medios de cultivo sintéticos definidos o semi-definidos. Nuestro grupo de trabajo ha reportado el único estudio en producir embriones de llama in vitro en un medio de cultivo definido (SOF) sin co-cultivo con células somáticas, obteniendo blastocistos expandidos (17%, 16/94) utilizando gametas de animales vivos (Conde *et al.*, 2008). En nuestro laboratorio hemos logrado producir un 9% de blastocistos eclosionados luego de 6 días de cultivo en medio SOFaa y un 15% (5/33) de blastocistos expandidos luego del cultivo en DMEM-F12 (Trasorras *et al.*, 2011).

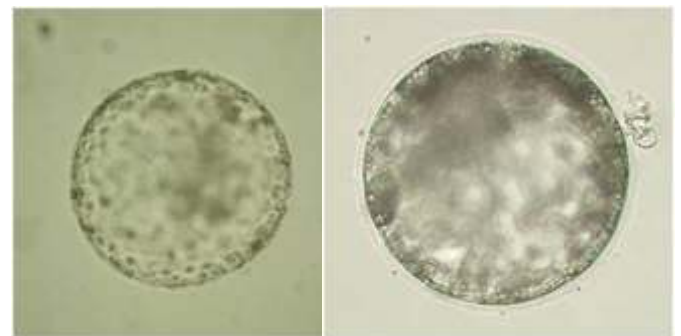


Figura 3. Blastocistos de llama obtenidos por FIV (a) e ICSI (b) con semen fresco



BIBLIOGRAFIA

- Aba, M.A.; M. Forsberg; H. Kindhal; J. Sumar; L.E. Edqvist. 1995. Endocrine changes after mating in pregnant and non-pregnant llamas and alpacas. *Acta Vet. Scand.*, 36: 489-498.
- Adam, C.L.; D.A. Bourke; C.E. Kyle; P. Young; T.G. McEvoy. 1992. Ovulation and embryo recovery in the llama. *Proc. 1st Int. Camel Conf.*: 125-127.
- Berland, M.A.; A. von Baer; J. Ruiz; V. Parraguez; P. Morales; G.P. Adams; M.H. Ratto. 2011. *In vitro* fertilization and development of cumulus oocyte complexes collected by ultrasound-guided follicular aspiration in superstimulated llamas. *Theriogenology*, 75: 1482-1488.
- Bourke, D.A.; C.L. Adam; C.E. Kyle; T.G. McEvoy; P. Young. 1992. Ovulation, superovulation and embryo recovery in llamas. *Proc. 12th Int. Cong. Anim. Reprod.*, 1: 193-195.
- Bourke, D.A.; C.E. Kyle; T. McEvoy; P. Young; C.L. Adam. 1995. Advanced reproductive technologies in South American Camelids. In: *Proceedings of the Second European Symposium on South American Camelids*: 235-243.
- Bravo, P.W.; T. Tsutsui; B.L. Lasley. 1995. Dose response to equine chorionic gonadotrophin and subsequent ovulation in llamas. *Small Rumin. Res.*, 18: 157-163.
- Brogliatti, G.M.; A.T. Palasz; H. Rodriguez-Martinez; R.J. Mapletoft; G.P. Adams. 2000. Transvaginal collection and ultrastructure of llama (*Lama glama*) oocytes. *Theriogenology*, 54: 1269-1279.
- Carretero, M.I.; M. Miragaya; M.G. Chaves; M.C. Gambarotta; A. Agüero. 2010. Embryo production in superstimulated llamas pretreated to inhibit follicular growth. *Small Ruminant Research* 88: 32-37.
- Conde, P.A.; C. Herrera; V.L. Trasorras; S., Giuliano; A. Director; M.H. Miragaya; M.G. Chaves; M.I. Sarchi; D. Stivale; C. Quintans; A. Agüero; B. Rutter; S. Pasqualini. 2008. In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Animal Reproduction Science*, 109: 298-308.
- Condori, R.L.; W. Huanca; M. Chileno; J. Cainzo; F. Valverde; J.J. Becerra; L.A. Quintela; P.G. Herradon. 2010. Effect of follicle-stimulating hormone addition on in vitro maturation and cleavage of alpaca (*Vicugna pacos*) embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 23, 224.
- Del Campo, M.R.; M.X. Donoso; C.H. Del Campo; R. Rojo; C. Barros; J.J. Parrish; R.J. Mapletoft. 1992. In vitro maturation of llama (*Lama glama*) oocytes. In: *Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction*, 324-326.
- Del Campo, M.; C. Del Campo; M. Donoso; M. Berland; R. Mapletoft. 1994. In vitro fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology* 41:1219-1229.
- Gamarra, G.; E. Huaman; S. León; M. Carpio; E. Alvarado; M. Asparrin; W. Vivanco. 2008. First in vitro embryo production in alpacas (*Lama Pacos*). *Reproduction, Fertility and Development* 21: 177-178.
- Gomez, G.; M.H. Ratto; M. Berland; M. Wolter; G.P. Adams. 2002. Superstimulatory response and oocyte collection in alpacas. *Theriogenology*, 57: 584.
- Huanca, W.; R. Condori; J. Cainzos; M. Chileno; L. Quintela; J. Becerra; P.G. Herradon. 2009. 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*, 22: 327.
- Miragaya, M.H.; Chaves, M.G.; Agüero, A. 2006. Reproductive biotechnology in South American Camelids. *Small Ruminant Research*, 61: 299-310.
- Miragaya, M.H.; C. Herrera; C.J. Quintans; M.G. Chaves; E.F. Capdevielle; S.M. Giuliano; M.R. Pinto; J. Egey; B. Rutter; R.S. Pasqualini; A. Agüero. 2003. Producción in vitro de embriones de llama (*Lama glama*) por la técnica de ICSI: resultados preliminares. *Proc. III Congreso Mundial sobre Camélidos, Bolivia*, 267-270.
- Ratto, M.H.; M. Berland; G.P. Adams. 2002. Ovarian superstimulation and ultrasound-guided oocyte collection in llamas. *Theriogenology*, 57: 590.
- Ratto, M.H.; M. Berland; W. Huanca; J. Singh; G.P. Adams. 2005. In vitro and in vivo maturation of llama oocytes. *Theriogenology*, 63: 2445-2457
- Ratto, M.H.; C. Gomez; M. Berland; G.P. Adams. 2007. Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Animal Reproduction Science*, 97: 246-256.
- Sansinena, M.J.; S.A. Taylor; P.J. Taylor; E.E. Schmidt; R.S. Denniston; R.A. Godke. 2007. In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Animal Reproduction Science* 99:342-353.
- Trasorras, V.; M. Chaves; M. Miragaya; M. Pinto; B. Butter; M. Flores; A. Agüero. 2009. Effect of eCG superstimulation and busserelin on cumulus-oocyte complexes recovery and maturation in llamas (*Lama glama*). *Reproduction in Domestic Animals*, 44: 359-364.
- Trasorras, V.L.; S. Giuliano; M.G. Chaves; D. Neild; A. Agüero; M. Carretero; M. Pinto; C. Baca Castex; A. Alonso, D. Rodriguez, D., Morrell; M. Miragaya. 2011. 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. *Reproduction in Domestic Animals*, DOI: 10.1111

