

Artículo corto:

EFFECTO DEL TIEMPO DE MADURACIÓN *in vitro* EN LA CAPACIDAD MEIÓTICA Y DESARROLLO DE EMBRIONES DE LLAMA

Effect of time *in vitro* maturation in the meiotic ability and embryonic development of Llama

A. Ayuque, E. Justiniano, J. Mendoza, L. Landeo, J. Ruiz*

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

**E-mail (Jaime Ruiz): jaruizbejar@yahoo.es*

RESUMEN

El objetivo fue evaluar diferentes tiempos para el cultivo *in vitro* de ovocitos de llama en la tasa de maduración nuclear y en el desarrollo de embriones producidos por fecundación *in vitro* (FIV). Se seleccionaron 672 ovocitos, los cuales fueron madurados *in vitro* (MIV) por 28, 36 y 42 horas. En el primer ensayo, los ovocitos maduros fueron fijados en una solución de metanol: ácido acético (3:1) y teñidos con orceína acética al 1%. En el segundo ensayo, los ovocitos fueron fecundados luego de MIV por 28, 36 y 42 horas. El mayor porcentaje de ovocitos en metafase II se obtuvo a las 36 y 42 horas ($70.2 \pm 4.2\%$ y $70.5 \pm 3.7\%$), seguido de 28 horas ($49.1 \pm 2.8\%$). En el segundo ensayo se obtuvo a las 36 horas para segmentación y blastocisto ($51.0 \pm 3.3\%$ y $11.6 \pm 1.3\%$) y para 42 horas ($49.6 \pm 3.6\%$ y $12.5 \pm 2.2\%$) respectivamente. Los tiempos de 36 y 42 horas son mejores que 28 horas.

Palabras clave: *ovocitos, in vitro, metafase II, llama.*

ABSTRACT

The aim was to evaluate different times for the *in vitro* culture of llama oocytes in the rate of nuclear maturation and in the development of embryos produced by *in vitro* fertilization (IVF). 672 oocytes were selected which were matured *in vitro* (IVM) for 28, 36 and 42 hours. In the first experiment, Mature oocytes were fixed in a solution of methanol: acetic acid (3: 1) and stained with 1% acetic orcein. In the second experiment, the oocytes were fertilized after IVM for 28, 36 and 42 hours. The highest percentage of metaphase II oocytes were obtained at 36 and 42 hours ($70.2 \pm 4.2\%$ and $70.5 \pm 3.7\%$), followed by 28 hours ($49.1 \pm 2.8\%$). In the second experiment was obtained at 36 hours for segmentation and blastocyst ($51.0 \pm 3.3\%$ and $11.6 \pm 1.3\%$) and 42 hours ($49.6 \pm 3.6\%$ and $12.5 \pm 2.2\%$) respectively. The times of 36 and 42 hours are better than 28 hours.

Keywords: *oocytes, in vitro, metaphase II, llama.*



INTRODUCCIÓN

Existen varios reportes de embriones producidos por FIV en camélidos sudamericanos (Gamarrá *et al.* 2008, Mendoza *et al.*, 2008, Berland *et al.*, 2011, Huamán *et al.*, 2011), asimismo existen reportes de gestaciones tempranas en alpacas (Mendoza *et al.*, 2013) y en llamas (Mendoza *et al.*, 2013, Trasorras *et al.*, 2014), sin embargo se necesitan mayores estudios que nos permitan estandarizar y optimizar protocolos de MIV y FIV y así obtener embriones de alpaca y llama de mayor calidad para que al ser transferidas en receptoras sincronizadas, puedan lograr mayores tasas de gestación lograr los primeros nacimientos por FIV en camélidos sudamericanos.

Con respecto a la maduración *in vitro*, Ratto *et al.* (2005) indican que no existen diferencias significativas entre 28, 30 y 36 horas en las tasas de maduración de ovocitos de llamas. Por otro lado, en la maduración *in vitro* de ovocitos de alpacas se han utilizado diferentes tiempos tales como: 24-26 horas (Ruiz *et al.*, 2007, Mendoza *et al.*, 2008, Huamán *et al.*, 2011) y 30 horas (Gamarrá *et al.*, 2008). Sin embargo, Huanca *et al.* (2009) indican que son necesarias más de 38 horas para la maduración *in vitro* y Santayana *et al.* (2012) encontraron mayores tasas de ovocitos en metafase II y mayores tasas de segmentación, mórulas y blastocistos con 32 horas, frente a 28 y 24 horas de maduración *in vitro* de ovocitos de alpacas. Estos resultados nos llevan a pensar que el tiempo óptimo de maduración *in vitro* de ovocitos de llama aún no está definido.

Por tales motivos en el presente estudio se planteó el objetivo fue evaluar diferentes tiempos para el cultivo *in vitro* de ovocitos de llama en la tasa de maduración nuclear y en el desarrollo de embriones producidos por fecundación *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recuperaron 1100 complejos ovocito-cúmulus (COCs) mediante aspiración folicular de 178 ovarios de llamas provenientes del camal municipal de Huancavelica; donde un grupo de 672 ovocitos de categoría I y II fueron seleccionados bajo un microscopio estereoscópico con aumento de 30X. La recuperación y selección de los COCs se realizó dentro de las 3 horas de sacrificio de las llamas. Para la maduración *in vitro* de los COCs, se tomaron diferentes tiempo de cultivo: 28, 36 y 42 horas, los COCs fueron mantenidos en una atmósfera húmeda con 5% CO₂ a 38.5 °C, en medio TCM-199 suplementado con 25 mM de hepes, piruvato de sodio 0.2 mM, sulfato gentamicina 50 ug/ml, FSH 0.02 unidades/ml, estradiol 17-β 1 ug/ml y suero fetal bovino al 10%.

Para el primer ensayo, los COCs fueron sumergidos en una solución de metanol absoluto: ácido acético glacial (3:1) durante 24 horas y posteriormente teñidos con orceína acética al 1%. La morfología nuclear de los ovocitos fue evaluada bajo un microscopio invertido con aumento de 40X y clasificados en función a su estadio nuclear como: vesícula germinal (VG), vesícula germinal rota (GVBD), metafase I (MI) y metafase II (MII). Para el segundo ensayo, se recuperaron espermatozoides epididimarios de testículos provenientes del Camal Municipal de Huancavelica.

La recuperación de espermatozoides se realizó siguiendo el procedimiento de Mendoza *et al.*, (2008). Transcurridos los tiempos de maduración *in vitro* (36 y 42 horas), los ovocitos fueron colocados en microgotas de 50 µl de Fert-Talp con una concentración de 3 x 10⁶ espermatozoides vivos/ml (concentración final en la gota) y luego de las 18 horas del cultivo ovocito-espermatozoide, los supuestos cigotos fueron transferidos en microgotas de 50 µl de medio de cultivo de embriones SOF-IVC y mantenidos en una estufa de cultivo con 5% de CO₂ al aire y 90% de humedad relativa por un periodo máximo de 8 días.

Los resultados obtenidos de maduración nuclear y desarrollo embrionario fueron expresados en porcentajes y transformados a arcoseno para el análisis de varianza, el cual se realizó con un Diseño Completamente al Azar. Se utilizó la prueba de Duncan para contrastar la diferencia entre promedios (p<0.05). Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS v.15.0 para Windows.

RESULTADOS

Maduración nuclear de ovocitos de llama

En la Tabla 1 se muestran los resultados de maduración nuclear con 28, 36 y 42 horas de maduración *in vitro* de ovocitos de llama.

Fecundación *in vitro* de ovocitos de llama

En la Tabla 2 se muestran los resultados de embriones producidos por fecundación *in vitro* utilizando 36 y 42 horas de maduración de ovocitos de llama. No se evaluó 28 horas de maduración *in vitro* porque en el primer ensayo sus tasas de maduración nuclear fueron significativamente menores frente a 36 y 42 horas (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto del tiempo de maduración *in vitro* sobre la maduración nuclear de ovocitos de llama.

Tiempo de maduración <i>in vitro</i> (horas)	Nº Total de ovocitos (Replicas)	Estadios de maduración nuclear			
		Nº de ovocitos inmaduros			Nº de ovocitos maduros
		(media ± S.E.M.)			(media ± S.E.M.)
		VG	GVBD	M-I	M-II
28	223 (7)	4 (1.46 ± 0.52) ^a	7 (3.03 ± 0.84) ^a	84 (37.75 ± 1.00) ^a	112 (49.14 ± 2.79) ^b
36	222 (7)	5 (1.83 ± 0.73) ^a	3 (1.67 ± 1.10) ^a	41 (18.88 ± 1.11) ^b	159 (70.17 ± 4.21) ^b
42	227 (7)	5 (1.83 ± 0.73) ^a	6 (2.42 ± 1.09) ^a	41 (18.55 ± 2.97) ^b	160 (70.53 ± 3.72) ^b

VG: Vesícula germinal; GVBD: Vesícula germinal rota; M-I: Metafase I; M-II: Metafase II. letras diferentes en la misma columna denotan diferencias estadísticas significativas (p<0.05).

Tabla 2: Efecto del tiempo de maduración *in vitro* de ovocitos de llama sobre el desarrollo embrionario luego de la fecundación *in vitro*.

Tiempo de maduración <i>in vitro</i> (horas)	Nº Total de ovocitos inseminados (Replicas)	Estadios de desarrollo embrionario (media ± S.E.M.)	
		Segmentación (48 horas)	Blastocisto (7 días)
36	66 (3)	34/66 (51.00 ± 3.31) ^a	4/34 (11.64 ± 1.30) ^a
42	80 (3)	40/80 (49.55 ± 3.56) ^a	5/40 (12.51 ± 2.22) ^a

letras diferentes en la misma columna denotan diferencias estadísticas significativas (p<0.05)

DISCUSIÓN

Maduración nuclear de ovocitos de llama

Ratto *et al.*, (2005) obtuvieron 77.7%, 80.6% y 80.4% de COCs de llama en metafase II con 28, 30 y 36 horas de

maduración sin diferencias estadísticas entre los 3 tiempos evaluados, concluyendo que se puede madurar *in vitro* ovocitos de llama por un tiempo de 28 horas. Por otro lado Huanca *et al.*, (2009), recomendaron 38 horas o más para la maduración *in vitro* de COCs de alpaca, debido a que encontraron 18.9%, 42.9% y 65.8% de COCs en Metafase II para 30, 34 y 38 horas de maduración *in vitro* respectivamente.

Asimismo Santayana *et al.* (2012), encontraron que el mayor porcentaje de ovocitos de alpaca en metafase II fue alcanzado a las 32 h de cultivo *in vitro* con un 65.1% seguido por el de 28 horas con 50.3% y finalmente el de 24 horas con un 46.3%, observándose un aumento gradual de ovocitos en metafase II hacia el mayor tiempo de maduración.

En el presente estudio, se encontró una tendencia similar a lo reportado por Santayana *et al.*, (2012), alcanzando un mayor porcentaje de maduración nuclear cuando se evaluó tiempos de 36 y 42 horas con 70.2±4.2% y 70.5±3.7% respectivamente seguido de 28 horas con 49.1±2.8%, lo cual es diferente a lo reportado por Ratto *et al.* (2005), quienes recuperaron COCs de ovarios 8 horas después del beneficio de las llamas, frente al presente estudio en donde los ovarios utilizados fueron recuperados dentro de 3 horas del beneficio de las llamas. Estos resultados indican que los COCs de llama necesitan al menos 36 horas de cultivo para encontrar un mayor porcentaje de ovocitos en metafase II.

Fecundación *in vitro* de ovocitos de llama

En nuestro laboratorio por mucho tiempo hemos usado 24-26 horas como tiempo de maduración de ovocitos de alpaca, es así como Mendoza *et al.* (2008) obtuvo tasas de blastocistos menores al 10% y Huamán *et al.* (2011) obtuvieron 11% de blastocistos. Sin embargo, Santayana *et al.* (2012) encontraron que los porcentajes de segmentación y blastocistos 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. Como podemos observar, Santayana *et al.* (2012) reportó mayores tasas de blastocistos cuando utilizó 32 y 28 horas, comparado con los estudios de Mendoza *et al.* (2008) y Huamán *et al.* (2011).

En otro grupo de investigación, Huanca *et al.* (2009) encontraron una tendencia similar sin reportar el logro de blastocistos, en cuanto a las tasas de segmentación reportaron 9.5%, 7.7% y 15.4% para 30, 34 y 38 horas de maduración de ovocitos de alpaca respectivamente. En el presente estudio, obtuvimos para segmentación y blastocisto 51.0±3.3% y 11.6±1.3% respectivamente para 36 horas y el porcentaje de segmentación y blastocistode 49.6±3.6% y 12.5±2.2% para 42 horas respectivamente, sin encontrar diferencias estadísticas entre los tratamientos. Estos resultados indican que se requieren por lo menos 36 horas de maduración *in vitro* de COCs de llama para un buen desarrollo de embriones de alpaca producidos por fecundación *in vitro*.

CONCLUSIÓN

El tiempo para la maduración nuclear y la adquisición máxima de la capacidad de desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos de llama es de 36 horas, bajo las condiciones del presente estudio.

REFERENCIAS

- 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.
- 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.
- Huamán E, Ticllacuri 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. 2011. Trujillo – Perú.
- 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.
- 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. 2013. Lima – Perú.
- 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. 2008. Lima – Perú.
- 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 JA, Correa JE, Ayuque G, Landeo L, Yaranga M, Zacarías A. Producción *in vitro* de embriones partenogénéticos de alpaca y llama. I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica. 2007. Perú.
- 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. 2012. Arica. Chile.
- Trasorras V, Castex CB, Alonso A, Giuliano S, Cruz RS, Arraztoa C, Chaves G, Rodríguez D, Neild D, Miragaya M. 2014. 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

