

PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

S. M. Giuliano, V.L. Trasorras

Áreas de Física Biológica y Teriogenología, Instituto de Investigaciones y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, Argentina

E-mail: smgiulia@fvet.uba.ar

La producción *in vitro* de embriones demanda una gran cantidad de ovocitos capaces de ser fecundados. Los métodos utilizados para la obtención de ovocitos pos mortem son: aspiración o disección de los folículos de ovarios provenientes de mataderos; aspiración de los folículos luego de la exposición quirúrgica del ovario por laparotomía o la aspiración folicular guiada por ultrasonografía vía transvaginal. La utilización de ovarios provenientes de mataderos tiene como ventaja disponer de una enorme cantidad de ovocitos, pero su principal desventaja es que requiere de la maduración *in vitro* (IVM). Además, trabajando con ovocitos provenientes de ovarios de mataderos, se desconoce si los folículos considerados dominantes se encuentran en la fase de crecimiento o regresión, lo cual puede afectar la calidad ovocitaria. La obtención de ovocitos a partir de animales vivos ofrece la posibilidad de aumentar la progenie de hembras genéticamente superiores y disminuir el intervalo generacional. En estos animales se aplica un tratamiento de superestimulación ovárica previamente a la obtención de los ovocitos para inducir el crecimiento folicular múltiple y maximizar el aprovechamiento de esas hembras. En nuestro laboratorio se observó que iniciar el tratamiento en presencia de un folículo mayor a 5 mm induce el crecimiento de ese único folículo (Miragaya *et al.*, 2006). Las drogas más utilizadas en camélidos para inducir superestimulación ovárica son FSH y eCG, en forma individual o conjunta. Según nuestra experiencia, los tratamientos 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). Además, la superestimulación con eCG está asociada a una mayor proporción de complejos ovocito-cumulus (COC's) expandidos y COC's en MII, comparado con el tratamiento con FSH (Ratto *et al.*, 2005). Los camélidos son ovuladores inducidos, por lo tanto, la maduración *in vivo* de ovocitos dentro del folículo puede producirse mediante la inducción de la liberación de LH administrando análogos de GnRH, como la buserelina o hCG. La administración de buserelina fue beneficiosa para la recuperación de una gran cantidad de COC's expandidos, los cuales pueden ser utilizados directamente en técnicas de reproducción asistida sin necesitar de la previa maduración *in vitro* (Trasorras *et al.*, 2009).

Las técnicas de producción *in vitro* (PIV) de embriones incluyen: fertilización *in vitro* (IVF) e inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI). Existen pocas publicaciones sobre FIV en llamas. La primera fue realizada por Del Campo *et al.* (1994). En este trabajo utilizaron ovocitos provenientes de ovarios de matadero y espermatozoides de epidídimo en co-cultivo con células del oviducto. En nuestro laboratorio se han producido embriones por FIV (Trasorras *et al.*, 2005; Conde *et al.*, 2008, Trasorras *et al.*, 2010) e ICSI (Miragaya *et al.*, 2003; Conde *et al.*, 2008). Los estudios realizados en nuestro laboratorio representan la primera aplicación de FIV e ICSI con semen fresco de llama extraído mediante electroeyaculación y se pudieron obtener, por primera vez en el mundo, embriones producidos *in vitro* hasta el estadio de blastocisto expandido a partir de gametas de animales vivos.

La preparación del semen que se utiliza en PIV de embriones, requiere de la aplicación de técnicas con las cuales se recupere un alto porcentaje de espermatozoides móviles con morfología normal, libre de detritus y espermatozoides muertos. Para obtener embriones se han utilizado espermatozoides de epidídimo o de eyaculado. El uso de espermatozoides del epidídimo tiene la ventaja de que estas células tienen movilidad progresiva y que el manejo de la muestra es más fácil porque no tiene plasma seminal. La principal desventaja es que no se utiliza espermatozoides de machos genéticamente superiores. Utilizando espermatozoides eyaculados se pueden utilizar machos elegidos pero, por otro lado, la mayoría de los espermatozoides no se presentan movilidad progresiva y el manejo de las muestras es difícil debido a la viscosidad y a la filancia del plasma seminal. Para poder utilizar las técnicas de ICSI y FIV con semen de machos de alto valor genético, es necesario utilizar un buen método de recolección de semen y aplicar protocolos que permitan la separación y selección de espermatozoides móviles de del plasma seminal. En nuestro laboratorio se han producido embriones por FIV e ICSI utilizando eyaculados incubados en una solución de 1 mg/ml de colagenasa en medio H TALP BSA.

Las técnicas de cultivo embrionario *in vitro* pueden ser: co-cultivo de diferentes tipos de células o la utilización de medios de cultivos sintéticos definidos o semi-definidos. La utilización de co-cultivo con células somáticas es una técnica satisfactoria para producir embriones. Sin embargo, esta condición indefinida hace difícil o casi imposible examinar las necesidades nutricionales de los embriones y contribuye a la variabilidad en la composición del sistema de cultivo. Además, las células presentes en el medio de cultivo pueden competir con los embriones por los nutrientes o los desechos metabólicos pueden tener un efecto deletéreo en el desarrollo embrionario. La utilización de medios de cultivo definidos posibilitan evaluar las condiciones nutricionales necesarias para el desarrollo de los embriones hasta estadios óptimos para su transferencia. El diseño de dichos medios se basa en la dinámica de la fisiología embrionaria y metabólica y en la reducción del estrés intracelular. Además, se toman en cuenta los datos obtenidos del microambiente oviductal. En los CSA no existen datos publicados sobre la tasa de producción y composición del líquido producido por el oviducto. El desarrollo embrionario temprano *in vivo* en la llama parece ser más rápido comparado con otras especies, tal es así que se han recuperado *in vivo* mórulas de oviductos de llamas a los tres días pos-ovulación (Miragaya *et al.*, 2002). Para que este crecimiento rápido sea posible es necesario el aporte de un micro ambiente adecuado en nutrientes, iones, hormonas, proteínas, aminoácidos y factores de crecimiento que posiblemente estén presentes en el oviducto de estas especies.

La aplicación de técnicas de reproducción asistida en Camélidos Sudamericanos genéticamente superiores, permitirá un importante incremento en el número de embriones producidos *in vitro* y aumentará la eficiencia reproductiva de esta especie.

Referencia Bibliográfica

- Carretero M., Miragaya M., Chaves M., Gambarotta M., Agüero A. 2010. Embryo production in superstimulated llamas pre-treated to inhibit follicular growth. *Small Rum. Research* 88: 32-37.
- Conde P., Herrera C., Trasorras V., Giuliano S., Director A., Miragaya M., Chaves M., Sarchi M., Stivale D., Quintans C., Agüero A., Rutter B., Pasqualini S. 2008. In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Ani. Reprod. Science* 109: 298-308.
- Del Campo, M., Del Campo, C., Donoso, M., Berland, M., Mapletoft, R. 1994. In vitro fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology* 41: 1219-1229.
- Miragaya, M.H., Chaves, M.G., Capdevielle, E.F., Ferrer, M.S., Pinto, M., Rutter, B., Neild, D.M., Agüero, A., 2002. In vitro maturation of llama (*Lama glama*) oocytes obtained surgically using follicle aspiration. *Theriogenology* 57: 731.
- Miragaya, M.H., Herrera, C., Quintans, C.J., Chaves, M.G., Capdevielle, E.F., Giuliano, S.M., Pinto, M.R., Egey, J., Rutter, B., Pasqualini, R.S., Agüero, A. 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.
- Miragaya, M.H., Chaves, M.G., Agüero, A. 2006. Reproductive biotechnology in South American Camelids. *Small Ruminant Research* 61: 299-310.
- Ratto, M.H., Berland, M., Huanca, W., Singh, J., Adams, G.P. 2005. In vitro and in vivo maturation of llama oocytes. *Theriogenology* 63: 2445-2457.
- Trasorras, V.L., Chaves, M.G., Miragaya, M.H., Rutter, B., Giuliano, S.M., Director, A., Conde, P., Herrera, C., Agüero, A., 2005. Fertilización in vitro con semen fresco y complejos ovocito-cumulus (COC's) obtenidos por aspiración folicular, en la especie *Lama glama*. *In Vet.* 7: 234-235.
- Trasorras, V., Chaves, M., Miragaya, M., Pinto, M., Rutter, B., Flores, M., Agüero, A. 2009. Effect of eCG Superstimulation and Buserelin on Cumulus-oocyte complexes recovery and Maturation in llamas (*Lama glama*). *Reproduction in Domestic Animals* 44: 359-364.
- Trasorras, V., Giuliano, S.M., Chaves, M.G., Baca Castex, C., Carretero, M.I., Negro, V., Rodríguez, D., Miragaya, M.H. 2010. In Vitro production of llama embryos. *In Vet* 12(2)