

CAPACIDAD DE DESARROLLO DE OVOCITOS RECUPERADOS VÍA ASPIRACION TRANSVAGINAL EN LLAMAS Y ALPACAS

Jaime Ruiz¹ y Marcelo Ratto²

¹Universidad Nacional de Huancavelica, Perú, ²Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

E-mail: jaruizbejar@yahoo.es

Introducción

Ovarios de alpacas y llamas obtenidos de hembras beneficiadas en el camal han sido una fuente importante para la recuperación de complejos ovocito-cúmulo (COCs), facilitando gran disponibilidad de ovocitos para la investigación en la estandarización de protocolos de maduración y fecundación in vitro (Del Campo *et al.*, 1992; Del Campo *et al.*, 1994, Ratto *et al.*, 1999, Ruiz *et al.*, 2007, Mendoza *et al.*, 2008, Gamarra *et al.*, 2008). Es así que los primeros embriones de llama fueron producidos in vitro utilizando COCs colectados por punción de ovarios obtenidos en el camal (Del Campo *et al.*, 1994) y del mismo modo se logró los primeros embriones de alpaca (Gamarra *et al.*, 2008).

Asimismo se han realizado diversos intentos de recuperación de COCs a través de laparotomía lateral en llamas (Miragaya *et al.*, 2002, Sansinema *et al.*, 2007, Conde *et al.*, 2008); laparotomía ventral en vicuñas (Chaves *et al.*, 2003) y en alpacas (Gómez *et al.*, 2002, Ratto *et al.*, 2007, Gamarra *et al.*, 2007). Siempre con los mismos objetivos de estandarizar protocolos de maduración y fecundación in vitro, incorporándose además la posibilidad de la producción de embriones de llama (Sansinema *et al.*, 2007, Conde *et al.*, 2008) por inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Si bien estos autores en la mayoría de los casos lograron altas tasas de recuperación de COCs, la técnica de laparotomía es invasiva y útil solamente para aplicarla a manera de investigación, ya que limitaría la repetición de las sesiones de recuperación de COCs.

La aspiración transvaginal guiada por ultrasonografía ha sido descrita como una técnica no invasiva y repetible en equinos, caprinos y vacunos (Bracher y col 1993, Graff y col 1995, Kruip y col 1994). Su uso para recuperar COCs de llamas y alpacas vivas podría facilitar la maximización del potencial genético de las hembras de estas especies, a través de la producción de embriones por fecundación in vitro. Ya que se sabe que en forma natural las hembras de estas especies sólo pueden tener 4-5 crías en toda su vida reproductiva. Por lo que el objetivo de esta revisión es conocer el estado del arte y la competencia de desarrollo de los COCs colectados por aspiración folicular guiada por ultrasonografía en llamas y alpacas.

Desarrollo del tema

El primer reporte de la aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía fue realizado por Brogliatti *et al.* (2000), alcanzaron una tasa de colección de COCs de 65 % en llamas no estimuladas (n=10) frente a un 52 % en llamas estimuladas (n=5) hormonalmente (400 mg de NIH FSH-P dividido en 6 tratamientos diarios y con una dosis única de 100 UI de eCG al tercer día) para la superovulación. Sin embargo, en las llamas superestimuladas se recuperó un mayor número de COCs (9,0 vs. 3,1) y de mayor diámetro (7,7mm vs. 4,5mm). En este estudio se demostró la factibilidad del uso de esta técnica para la recuperación de ovocitos de llamas y además se describió la ultraestructura de los ovocitos.

Posteriormente estos resultados han sido mejorados por Ratto *et al.* (2005) quienes trabajaron con llamas del Centro de Investigación y Producción Quimsachata de la Estación Experimental ILLPA – INIA – Puno. Las llamas fueron tratadas ya sea con FSH o eCG para la superovulación 48 horas después de la ablación de los folículos mayores a 5 mm. El tratamiento con FSH (n=18) consistió de dos inyecciones diarias de 25 mg i.m. durante 4 días consecutivos más la adición de 5 mg i.m. de LH 36 horas después de la última aplicación de FSH. Las llamas tratadas (n=17) con eCG recibieron 1000 UI im como dosis única más la aplicación de 5 mg de LH 4 días después del tratamiento con eCG. Los COCs fueron aspirados transvaginalmente 20-22 horas después del tratamiento con LH. Lograron recuperar 71% y 74% de COCs con un número de COCs colectados de $10,7 \pm 2,1$ y $11,2 \pm 2,3$ en llamas superovuladas con FSH y eCG respectivamente. Además se describió las características morfológicas y el estado de maduración nuclear de los COCs colectados. En este estudio se demostró que tanto la FSH como la eCG son igualmente eficaces para la superovulación en llamas.

Por otro lado, Sansinema *et al.* (2007) utilizando la misma técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía obtuvieron una tasa de 61% de COCs en llamas superovuladas con FSH y los COCs recuperados por esta técnica fueron de menor calidad a los colectados por laparotomía lateral. En este estudio también se evaluó diferentes tratamientos de activación de embriones producidos por inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI): A) sin activación, B) activados sólo con ionomicina y C) activados con ionomicina y 6-Dimetilaminopurina (6-DMAP). Las tasas de segmentación a las 36 horas fueron 29 %, 33 % y 63 % para A, B y C con diferencias significativas a favor de C. Las tasas de embriones de 4-8 células después de las 48 horas fueron 7 %, 13 % y 38 % para A, B y C con diferencias estadísticas a favor de C. Estos resultados evidencian que los embriones producidos por ICSI en llama requieren de un tratamiento de activación química. Además que los ovocitos recuperados por aspiración transvaginal pueden ser utilizados para la producción in vitro de embriones. Sin embargo la técnica de ICSI requiere de un micromanipulador lo que la hace muy cara y además su aplicación es en casos especiales de problemas de calidad seminal de un reproductor macho.

También se ha utilizado la técnica de aspiración folicular guiada por ultrasonido para recuperar COCs en alpacas. Gamarra *et al.* (2008) lograron recuperar 6,0 COCs/alpaca cuando el tratamiento para la sincronización y superovulación se hizo con 0,78 mg de progesterona + estradiol (Día = 0) y una dosis de 700 UI de eCG al momento del retiro de las esponjas con progesterona (Día = 7) y cuando el tratamiento se hizo con LH (Día = 0) y eCG (Día = 2) recuperaron 6,1 COCs/alpaca. Otro grupo de investigación en alpacas encontró resultados un tanto diferentes (Huanca *et al.*, 2006), ellos observaron 4,5 folículos ováricos/alpaca mayores a 6 mm y lograron una tasa de recuperación de 55,5% COCs/alpaca las cuales fueron superovuladas con un tratamiento consistente de 200 mg de FSH dividido en una aplicación dos veces/día por 4 días consecutivos realizándose la aspiración de los folículos al sexto día. Estos resultados también evidencian que es posible la recuperación de COCs en alpacas utilizando la aspiración transvaginal guiada por ultrasonografía. Asimismo los diferentes resultados de recuperación de COCs por esta técnica obtenidos tanto en alpacas como en llamas puede estar influenciado por la experiencia de la persona que aplica la técnica. Sin embargo, lo ausente en las investigaciones arriba citadas es una evaluación sobre la competencia de desarrollo de los ovocitos en alpacas y llamas después de la fecundación in vitro.

Berland *et al.* (2011), realizaron un estudio con el objetivo de comparar la competencia de desarrollo de COCs colectados por aspiración folicular guiada por ultrasonografía en llamas tratadas con FSH o eCG. Se recuperaron $11,5 \pm 1,9$ y $9,7 \pm 1,2$ COCs en llamas superovuladas con FSH y eCG respectivamente. Los COCs expandidos colectados con ambos tratamientos fueron fecundados in vitro usando espermatozoides epididimarios. Los gametos fueron co-incubados a 38,5°C con 5% CO₂ por 18 horas. Después de la fecundación in vitro, los presuntos cigotos fueron incubados en medio SOF suplementado con 0,6% de albúmina de suero bovino (BSA) y coincubados con células de la granulosa de llama a 39 °C, 5 % CO₂, 5% O₂, 90 % N₂ por 7 días. El porcentaje de presuntos cigotos que desarrollaron a 2-8 células en el día 2 fueron: 65,3 % vs 63,1 %, mórulas en el día 5: 46,2 % vs. 42,5 % y blastocistos en el día 7 fueron: 23,1 % vs 20,5 % no fue diferente (P>0,05) estadísticamente entre las llamas tratadas con FSH y eCG respectivamente. Concluyendo que los COCs expandidos recuperados con FSH o eCG pueden ser utilizados directamente para la fecundación in vitro. Además que su competencia no fue afectada por el tratamiento con gonadotropinas.

Conclusiones

Es factible la recuperación de COCs de alpacas y llamas utilizando la aspiración transvaginal guiada por ultrasonografía .La cual al no ser invasiva permite la repetición de la técnica sin causar daño a la hembra donante. Los ovocitos colectados por esta técnica pueden ser utilizados para la producción de embriones tanto por ICSI y FIV. El tratamiento con FSH o eCG para la superovulación no afecta la competencia de desarrollo de los ovocitos.

Referencia

- Berland, M., Von Baer, A., Ruiz, J., Parraguez, V., Ratto M. 2011. In vitro fertilization and development of cumulus oocytes complexes collected by ultrasound-guided follicle aspiration in superstimulated llamas. *Theriogenology*. *Theriogenology* 75 (2011) 1482–1488
- Bracher, V., Parlevliet, J., Fazelli, A.R., Pieterse, M.C., Vos, P.L., Dieleman, S.J., Taverne, M.A., Colenbrander, B. 1993. Repeated transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in the mare. *Equine Vet. J.* 15 (Suppl):75-78.
- Brogliatti, G.M., Palasz, A.T., Rodriguez-Martinez, H., Mapletoft, R.J., Adams, G.P. 2000. Transvaginal collection and ultrastructure of llama (*Lama glama*) oocytes. *Theriogenology* 54: 1269-1279.
- Chaves, M., Miragaya, M., Capdevielle, E., Rutter, B., Guliano, S., Agüero, A. 2003. Maduración in vitro de oocitos de vicuña obtenidos por aspiración quirúrgica de folículos de ovarios superestimulados. *III Congreso de la Asociación Latinoamericana de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos*. ALEPRYCS. Viña del Mar – Chile.

- Conde, P.A., Herrera, C., Trasorras, V.L., Giuliano, S., Director, A., Miragaya, M.H., Chaves, M.G., Carchi, M.I., 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. *Animal Reproduction Science* 109: 298 – 308.
- Del Campo, M., Del Campo, C., Donoso, M., Berland, M., Mapletoft, R. 1994. In vitro fertilization and development of *Lama glama* oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology* 41: 1219-1229.
- Del Campo, M.R., Donoso, M.X., Del Campo, C.H. y col. 1992. In vitro maturation of Llama (*Lama glama*) oocytes. *Proc. 12th Int. Cong. Anim. Reprod.* Vol. 1, p 324.
- Gamarra, G., Huamán, E., León, S., Carpio, M., Alvarado, E., Asparrin, M., Vivanco, W. 2008. First in vitro embryo production in alpacas (*Lama pacos*). *Reproduction, Fertility and Development* 21, 177-178.
- Gamarra, G., Gallegos, A., Alvarado, E., Asparrin, M. and Vivanco, W. 2007. Techniques for ovum pick-up in gonadotropin-treated alpacas. *Reproduction, Fertility and Development* 20, 159–160.
- Gómez, C., Ratto, M.H., Berland, M., Wolter, M., Adams, G.P. 2002. Superstimulatory response and oocyte collection in Alpacas. *Theriogenology* 57: 584 (Abstract).
- Graff, K.J., Meintjes, M., Paul, J.B., Dyer, V.W., Denniston, R.S., Ziomek, C., Godke, RA. 1995. Ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery from FSH-treated goats for IVF. *Theriogenology* 43:223 abstr.
- Huanca, W., Ratto, M., Vásquez, M., Cervantes, M., Cordero, A., Enciso, M., Huanca, T., Adams, G. 2006. 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.
- Kruip, T.A.M., Boni, R., Wurth, Y.A., Roelofsen, M.W.M., Pietersen, M.C. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 42:675-684.
- 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 (1): 731.
- Mendoza J, Ayuque A, Triviño F, Ayuque G, Landeo L y Ruiz J. 2008. Evaluación de dos métodos de recuperación de espermatozoides epididimarios para la fecundación in vitro de ovocitos de alpaca. *XXXI Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal*. UNALM. Lima – Perú.
- Ratto M, C Gómez, M Berland, G Adams. 2007. Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Animal Reproduction Science* 97: 246-256.
- Ratto M, M Berland, W Huanca, J Singh, G Adams. 2005. In vitro and in vivo maturation of llama oocytes. *Theriogenology* 63: 2445-2457.
- Ratto M, M Wolter, C Gomez, M Berland, GP Adams. 1999. In vitro maturation of lama oocytes. Libro de resúmenes. *II Congreso Mundial sobre Camélidos*. Cuzco-Perú.
- Ruiz JA, JE Correa, G Ayuque, L Landeo, M Yaranga, A Zacarías. 2007. Producción in vitro de embriones partenogénéticos de alpaca y llama. *I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos*. Universidad Nacional de Huancavelica, Perú.
- Sansinema, M., Taylos, S., Taylor, P., Schmidt, E., Denniston, R., Godke, R. 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.