

## FACTORES QUE AFECTAN EL DESARROLLO DE LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* EN CAMÉLIDOS

Factors affecting the development of *in vitro* fertilization in camelids

V.L. Trasorras, M.H. Miragaya

Cátedra de Teriogenología,  
Instituto de Investigación y  
Tecnología en Reproducción  
Animal (INITRA), Facultad  
de Ciencias Veterinarias,  
Universidad de Buenos  
Aires, Argentina

E-mail:  
vtrasorras@fvet.uba.ar

### RESUMEN

En todo programa de producción de embriones *in vitro*, el objetivo final es desarrollar embriones de alta calidad, capaces de llevar a cabo una gestación normal y dando como resultado el nacimiento de crías sanas, meta que aún no ha podido ser alcanzada en los camélidos. La aplicación de técnicas de reproducción asistida, como la fecundación *in vitro* y el posterior cultivo embrionario *in vitro*, permiten ampliar el conocimiento del desarrollo embrionario temprano y posibilitan el aumento de la población de animales genéticamente superiores.

**Palabras clave:** ovocito, espermatozoide, fecundación *in vitro*, embrión

### ABSTRACT

In any program of *in vitro* embryo production, the ultimate goal is to develop high quality embryos being able to get a normal pregnancy and finally resulting in the birth of a healthy offspring, goal not reach yet in camelids. The application of assisted reproductive techniques, such as *in vitro* fertilization and subsequent *in vitro* embryo culture, can extend the knowledge of early embryonic development and make possible the increase of the population of genetically superior animals.

**Keywords:** oocyte, spermatozoa, *in vitro* fertilization, embryo.

## INTRODUCTION

Tanto en los países de origen de los Camélidos Sudamericanos (CSA), como Perú, Chile, Argentina y Bolivia, así como en Estados Unidos, Italia y Australia, existe un gran interés alrededor del mundo de los camélidos. Algunos de estos intereses surgen por la calidad de la fibra, la cual presenta un diámetro menor al del ovino, en el caso de la vicuña y alpaca. Otros resultan simplemente de la mera curiosidad acerca de la reproducción de estas especies, ya que presentan muchas características distintivas. Como ya es sabido, los CSA se encuentran representados por cuatro especies, dos de las cuales, la alpaca (*Vicugna pacos*) y la llama (*Lama glama*) son domésticas, mientras que el guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*) son silvestres. Sin embargo, como las especies silvestres se encontraron en peligro de extinción, actualmente pueden ser aprovechadas y comercializadas con ciertas restricciones nacionales e internacionales, ya que se encuentran protegidas por la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES). Es así como a partir de los estudios realizados en las especies domésticas se logra implementar protocolos ya establecidos en las especies silvestres. No obstante, la aplicación de técnicas de reproducción asistida, como la producción de embriones *in vitro*, queda restringida únicamente a las especies domésticas y aun así, son escasos los resultados de las investigaciones obtenidos hasta el momento en este campo.

Muchos son los factores a tener en cuenta a la hora de realizar la producción de embriones *in vitro*. En este capítulo repasaremos los puntos principales.

El origen de los ovocitos:

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). Otra técnica es la punción vía transvaginal con guía ultrasonográfica pero el porcentaje de complejos ovocito-cumulus (COC's) recuperados varía entre 52% (Brogliatti *et al.*, 2000), 74% (Ratto *et al.*, 2002) y 77% (Berland *et al.*, 2011) en hembras superestimuladas.

El origen de los espermatozoides:

La obtención, procesamiento y conservación del semen, juega un rol fundamental en la aplicación de cualquier técnica de reproducción asistida. La gran mayoría de los estudios fueron realizados a partir de espermatozoides provenientes del epidídimo de animales de matadero (Del Campo *et al.*, 1994; Gomez *et al.*, 2002; Ratto *et al.*, 2007; Gamarra *et al.*, 2008; Huanca *et al.*, 2009, 2010; Condori *et al.*, 2010; Berland *et al.*, 2011). Otros estudios utilizaron espermatozoides a partir de la aspiración del semen del fondo de vagina luego de la cópula (Sansinena *et al.*, 2007) o mediante recuperación del semen por vagina artificial (Miragaya *et al.*, 2003) o electroeyacuación (Conde *et al.*, 2008; Trasorras *et al.*, 2012, 2014). El semen de llama es altamente viscoso y filante

(Lichtenwalner *et al.*, 1996; Bravo *et al.*, 1997; Casaretto *et al.*, 2012). Además, presenta un bajo volumen y baja concentración espermática (Gaully y Leidinger, 1995; Lichtenwalner *et al.*, 1996; Director *et al.*, 2004; Giuliano *et al.*, 2008). Los espermatozoides no presentan movilidad progresiva inmediatamente después de haber sido eyaculados (Giuliano *et al.*, 2010) y es por esto que su uso en técnicas de reproducción asistida resulta imposible sin un tratamiento previo. Se han utilizado diferentes enzimas para mejorar las características reológicas del plasma seminal, obteniéndose mejores resultados con colagenasa (Bravo *et al.*, 2000; Giuliano *et al.*, 2010). Además, la utilización de semen fresco previamente tratado con esta enzima al 0,1% no inhibe la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Conde *et al.*, 2008).

La técnica de reproducción asistida a implementar:

Existen pocas publicaciones sobre fecundación *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.*, 2012, 2014), siempre utilizando gametas de animales vivos. 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. Además, nuestro laboratorio ha comunicado la primera preñez en llamas de embriones producidos *in vitro*, obtenidos a partir de ovocitos madurados *in vivo* y fertilizados *in vitro* con espermatozoides de eyaculado (Trasorras *et al.*, 2014).

El cultivo embrionario *in vitro*:

Las técnicas que se utilizan para el 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. Utilizando el medio de cultivo SOF con el agregado de SFB y realizando la renovación del medio de cultivo cada 48 horas, nuestro grupo de trabajo obtuvo la primera preñez en la llama a partir de un embrión producido *in vitro* (Trasorras *et al.*, 2014).

## CONCLUSION

Son muchos los factores que aún faltan delucidar para estandarizar la fecundación *in vitro* en los camélidos. A pesar de los pocos trabajos realizados hasta el momento, son alentadores los resultados alcanzados. Es necesario seguir avanzando con estas investigaciones para lograr el nacimiento de crías de camélidos a partir de embriones producidos *in vitro*.

## REFERENCIAS

- Berland MA, von Baer A, Ruiz J, Parraguez V, Morales P, Adams GP, Ratto MH. In vitro fertilization and development of cumulus oocyte complexes collected by ultrasound-guided follicular aspiration in superstimulated llamas. *Theriogenology*, 2011. 75:1482-1488.
- Bravo P, Callo M, Garnica J. The effect of enzymes on semen viscosity in Llamas and Alpacas. *Small Rumin. Res.*, 2000. 38: 91-95.
- Bravo P, Flores D, Ordoñez C. Effect of repeated collection on semen characteristics of Alpacas. *Biol. Reprod.*, 1997. 57: 520-524.
- Brogliatti GM, Palasz AT, Rodriguez-Martinez H, Mapletoft RJ, Adams GP. Transvaginal collection and ultrastructure of llama (*Lama glama*) oocytes. *Theriogenology*, 2000. 54: 1269-1279.
- Casaretto C, Martínez Sarrasague M, Giuliano S, Rubín de Celis E, Gambarotta M, Carretero I, Miragaya M. Evaluation of *Lama glama* semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer. *Andrologia*, 2012. 44: 335-341.
- Conde PA, Herrera C, Trasorras VL, Giuliano S, Director A, Miragaya MH, Chaves MG, Sarchi 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. *Anim. Reprod. Sci.*, 2008. 109: 298-308.
- Condori RL, Huanca W, Chileno M, Cainzo J, Valverde F, Becerra JJ, Quintela LA, Herradon PG. Effect of follicle-stimulating hormone addition on in vitro maturation and cleavage of alpaca (*Vicugna pacos*) embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2010. 23: 224.
- Del Campo MR, Donoso MX, Del Campo CH, Rojo R, Barros C, Parrish JJ, Mapletoft RJ. In vitro maturation of llama (*Lama glama*) oocytes. In: Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction, 1992. 324-326.
- Del Campo M, Del Campo C, Donoso M, Berland M, Mapletoft R. In vitro fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology*, 1994. 41: 1219-1229.
- Director A, Giuliano S, Miragaya M. Evaluation of llama (*Lama glama*) semen obtained by electroejaculation or using an artificial vagina. Proceedings 15th International Congress on Animal Reproduction (ICAR): 2004. 216.
- Gamarra G, Huaman E, León S, Carpio M, Alvarado E, Asparrin M, Vivanco W. First in vitro embryo production in alpacas (*Lama Pacos*). *Reprod. Fertil. Dev.* 2008. 21, 177-178.
- Gauly M, Leidinger H. Semen quality, characteristics volume distribution and hypoosmotic sensitivity of spermatozoa of *Lama glama* and *Lama guanicoe*. In: Gerken M, Renieri C. (Ed.), Proceedings of the 2nd European Symposium on South American Camelids. Publ. Università degli Studi di Camerino, 1995. p. 245-249.
- Giuliano S, Carretero M, Gambarotta M, Neild D, Trasorras V, Pinto M, Miragaya M. Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Anim. Reprod. Sci.*, 2010. 118: 98-102.
- Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim. Reprod. Sci.*, 2008. 104: 359-369.
- Gomez G, Ratto MH, Berland M, Wolter M, Adams GP. Superstimulatory response and oocyte collection in alpacas. *Theriogenology*, 2002. 57: 584.
- 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. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2009. 22: 327.
- Huanca W, Condori RL, Chileno MA, Cainzos J, Becerra JJ, Quintela LA, Herradon PG. In vivo maturation and in vitro fertilization of alpaca oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2010. 23: 204.
- Lichtenwalner AB, Woods GL, Weber JA. Seminal collection, seminal characteristics and pattern of ejaculation in llamas. *Theriogenology*, 1996. 46: 293-305.
- Miragaya MH, Herrera C, Quintans CJ, Chaves MG, Capdevielle EF, Giuliano SM, Pinto MR, Egey J, Rutter B, Pasqualini RS, Agüero A. Producción in vitro de embriones de llama (*Lama glama*) por la técnica de ICSI: resultados preliminares. Actas III Congreso Mundial sobre Camélidos, Bolivia: 2003. 267-270.
- Ratto MH, Berland M, Adams GP. Ovarian superstimulation and ultrasound-guided oocyte collection in llamas. *Theriogenology*, 2002. 57:590.
- Ratto MH, Berland M, Huanca W, Singh J, Adams GP. In vitro and in vivo maturation of llama oocytes. *Theriogenology*, 2005, 63: 2445-2457.
- Ratto MH, Gomez C, Berland M, Adams GP. Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Anim. Reprod. Sci.*, 2007. 97: 246-256.
- Sansinena MJ, Taylor SA, Taylor PJ, Schmidt EE, Denniston RS, Godke RA. In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 2007. 99, 342-353.
- Trasorras V, Chaves M, Miragaya M, Pinto M, Rutter B, Flores M, Agüero A. Effect of eCG Superstimulation and Buserelin on Cumulus-oocyte complexes recovery and Maturation in llamas (*Lama glama*). *Reprod. in Dom. Anim.*, 2009. 44: 359-364.
- Trasorras V, Giuliano S, Chaves G, Neild D, Agüero A, Carretero N, Santa Cruz R, Baca Castex C, Alonso A, Pinto M, Morell J, Miragaya M. In vitro embryo production in llamas (*Lama glama*) from in vivo matured oocytes with fresh semen processed with Androcoll-E™ using defined embryo culture media. *Reprod. Domest. Anim.*, 2012, 47: 562-567.
- Trasorras VL, Baca Castex C, Alonso A, Giuliano S, Santa Cruz R, Arraztoa C, Chaves MG, 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. *Anim. Reprod. Sci.*, 2014. 148: 83-89.