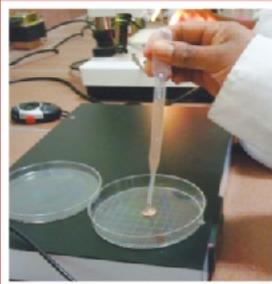
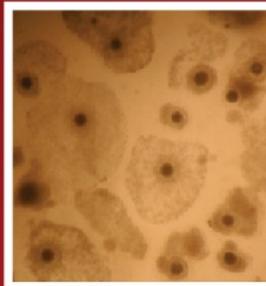




COLEGIO DE INGENIEROS DEL PERÚ



BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS



JAIME RUIZ BEJAR



COLEGIO DE INGENIEROS DEL PERÚ

BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

ARCHIVO SOLO PARA VISUALIZACIÓN DIGITAL

AUTOR:
JAIME RUIZ BEJAR

LIMA / PERÚ
2022



**COLEGIO DE
INGENIEROS
DEL PERÚ**

BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

© Jaime Ruiz Bejar

Primera edición digital: julio del 2022

Editado por :

© Colegio de Ingenieros del Perú - Consejo Nacional

Av. Arequipa 4947, Miraflores - Lima

www.cip.org.pe | Tel. 445-6540 / 446-6997

Derechos reservados

ISBN N° 978-9972-9465-8-5

Hecho el depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N° 2022-06911

Prohibida la reproducción parcial o total de la presente obra, bajo cualquier medio que sea posible, sin el permiso expreso de los editores y el autor o autores.

El Colegio de Ingenieros del Perú no se verá afectado por el contenido de la obra. En consecuencia, el autor o autores serán los responsables de responder ante cualquier controversia o conflicto de interés.

Publicado en el Perú

Dedicatoria

A la memoria de mis recordados amigos y colegas:

José Eduardo Saldaña Díaz

Humberto Guillermo Garayar Tasayco

Teodosio Huanca Mamani

Orlando Chipana Quispe

Tayne José Rodríguez Zavaleta

Samuel Edgar Bendezú Herencia

Ciro Antonio Salazar Montaña

Manuel Díaz Paredes

Siempre estarán presentes en nuestros pensamientos y oraciones.

A mis hijos Carmen Patricia y Antonio Sebastián con
todo el cariño y sentimiento que se pueda imaginar

Colaboradores

CARRETERO MARÍA IGNACIA

Médica Veterinaria y Doctora en Reproducción Animal. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Investigadora formada por el Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). Argentina.

Jefe de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Teriogenología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

e-mail: ignaciacarretero@fvvet.uba.ar, ignaciacarretero@gmail.com

CASTAÑEDA ALFONSO FLOR KATYA

Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de Huancavelica, Perú.

Magister en Producción Animal. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Doctora en Ciencias de la Educación. Universidad Nacional de Huancavelica, Perú.

Sub Gerente General. Instituto Latinoamericano de Lenguas Nativas y Cultura.

Asistente en equipamiento PMESUT. Ministerio de Educación, Perú.

e-mail: katya_9001@hotmail.com; katya.900193@gmail.com

CHICAIZA SANCHEZ LUIS ALONSO

Médico veterinario zootecnista. Universidad Técnica de Cotopaxi, Ecuador.

Magister en Producción Animal. Universidad Tecnológica Equinoccial, Ecuador.

Docente de la carrera de Medicina Veterinaria. Universidad Técnica de Cotopaxi, Ecuador.

e-mail: luis.chicaiza@utc.edu.pe

CUCHO DOLMOS HERNÁN CARLOS

Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Perú.

Magister en Producción Animal. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.

Profesor Asociado del Departamento Académico de Ganadería. Escuela Profesional de Zootecnia. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Perú.

e-mail: hernan.cucho@unsaac.edu.pe

FUMUSO FERNANDA GABRIELA

Médica Veterinaria y Doctora en Reproducción Animal. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Investigadora formada por el Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). Argentina.

JAIME RUIZ BÉJAR

Ayudante de Primera de la Cátedra de Teriogenología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
e-mail: ffumuso@fvvet.uba.ar

GIULIANO SUSANA MARÍA

Médica Veterinaria y Doctora en Reproducción Animal de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.
Investigadora formada por el Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA).
e-mail: smgiulia@fvvet.uba.ar

LANDEO JURADO LEANDRA

Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de Huancavelica.
Magister en Reproducción Animal. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
Asesora de la Vicepresidencia de Investigación. Universidad Nacional de Moquegua.
e-mail: lealandeo@gmail.com, llandeoj@unam.edu.pe

PAXIPATI PARRA ROLANDO CESAR

Ingeniero Zootecnista. Universidad Católica Boliviana “San Pablo”. Unidad Académica Campesina de Tiahuanacu, Bolivia.
Magister en Reproducción Animal. Universidad Nacional del Altiplano. Puno, Perú.
Candidato a Doctor en Ciencia Animal en la Universidad Nacional del Altiplano. Puno, Perú.
Profesor titular de la Universidad Católica Boliviana “San Pablo”. Unidad Académica Campesina de Tiahuanacu, Bolivia.
e-mail: paxipatiparra@gmail.com

PERUFFO ANTONELLA

Bióloga y Doctora en Medicina Animal. Universidad de Padova, Italia.
Profesor Asociado de Anatomía del Departamento de Biomedicina Comparada y Nutrición. Universidad de Padova, Italia.
e-mail: antonella.peruffo@unipd.it

PINO PANCHI EDWIN ORLANDO

Médico veterinario zootecnista. Universidad Técnica de Cotopaxi, Ecuador.
Magister en Producción Animal. Universidad Tecnológica Equinoccial, Ecuador.
Docente de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Ecuador.
e-mail: edwinpino1@yahoo.es

RATTO FUSTER MARCELO

Médico Veterinario. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Magister en Reproducción Animal. Universidad Austral de Chile.

PhD en Ciencias Biomédicas. Western College of Veterinary Medicine. Universidad de Saskatchewan, Canadá.

Posdoctorado en Biología Reproductiva. Escuela de Medicina. Universidad de Saskatchewan, Canadá.

Profesor titular del Instituto de Ciencia Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile.

e-mail: marceloratto@uach.cl

RUIZ BEJAR JAIME ANTONIO

Ingeniero Zootecnista y Magister en Producción Animal. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.

Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile.

Profesor Principal del Departamento Académico de Zootecnia de la Universidad Nacional de Huancavelica.

Vicepresidente de Investigación de la Universidad Nacional de Moquegua.

e-mail: jaime.ruiz@unh.edu.pe, jruizb@unam.edu.pe

SILVA JIMÉNEZ MAURICIO

Médico Veterinario, Magister en Ciencias Mención en Reproducción Animal y Doctor en Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile.

Profesor Asociado del Departamento de Ciencias Veterinarias y Salud Pública. Universidad Católica de Temuco, Chile.

e-mail: masilva@uct.cl

STELLETTA CALOGERO

Médico Veterinario. Universidad de Padova, Italia.

Doctor en Salud Pública e Higiene de los Alimentos. Universidad de Perugia, Italia.

Profesor agregado del Departamento de Medicina Animal, Producción y Salud. Universidad de Padova, Italia.

Profesor Principal del Departamento de Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Universidad de Ankara, Turquía.

e-mail: calogero.stelletta@unipd.it

VALDIVIA CUYA MARTHA ESTHER

Bióloga con mención en Genética. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Magister en Biología de la Reproducción. Universidad de Chile.

JAIME RUIZ BÉJAR

Doctora en Ciencias con mención en Fisiología. Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Profesora Principal del Departamento de Zoología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

e-mail: mvaldiviac@unmsm.edu.pe

VIVANCO MACKIE HENRY WILLIAM

Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.

Master of Science in Agriculture. Especializado en Reproducción y Genética Animal. California State Polytechnic University (Calpoly). Pomona, California, USA.

PhD in Animal Science. Especializado en Reproducción y Genética Animal. Utah State University. Logan, Utah, USA.

Profesor Visitante de la Escuela de Graduados del Departamento Académico de Producción Animal de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Fundador y Director Técnico de Vivanco International SAC, compañía consultora y de servicios en reproducción y mejora genética animal.

e-mail: williamvivanco@vivancoint.com

ARCHIVO SOLO PARA VISUALIZACIÓN INTERNA

Contenido

PRÓLOGO	13
PRESENTACIÓN	15
CAPÍTULO 1 EL FACTOR INDUCTOR DE OVULACIÓN PRESENTE EN EL PLASMA SEMINAL DE LLAMAS Y ALPACAS: HISTORIA Y CARACTERIZACIÓN. Mauricio Silva, Jaime Ruiz y Marcelo H. Ratto	19
CAPÍTULO 2 MORFOGÉNESIS INTRAUTERINA TEMPRANA DEL CEREBRO Y CARACTERIZACIÓN NEUROQUÍMICA DEL HIPOTÁLAMO EN EL FETO DE ALPACA. Calogero Stelletta, Jaime Ruiz y Antonella Peruffo.....	37
CAPÍTULO 3 ANÁLISIS DE SEMEN DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS ASISTIDO POR COMPUTADORA. Hernán Cucho	61
CAPÍTULO 4 RELACIÓN DEL PLASMA SEMINAL CON LOS ESPERMATOZOIDES DE SEMEN FRESCO Y CRIOPRESERVADO DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS. María Ignacia Carretero, Fernanda Gabriela Fumuso y María Susana Giuliano	81
CAPÍTULO 5 AVANCES DE CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN LLAMAS EN LA UNIDAD ACADÉMICA CAMPESINA DE TIAHUANACU – UNIVERSIDAD CATÓLICA BOLIVIANA “SAN PABLO”. Rolando Paxipati	109

CAPÍTULO 6

LA TRANSFERENCIA EMBRIONARIA EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS.

Henry William Vivanco 119

CAPÍTULO 7

AVANCES DE FECUNDACIÓN IN VITRO EN ALPACAS Y LLAMAS.

Jaime Ruiz..... 153

CAPÍTULO 8

ASPIRACIÓN FOLICULAR DE OVOCITOS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS.

Jaime Ruiz, Mauricio Silva y Marcelo H. Ratto 183

CAPÍTULO 9

VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS.

Leandra Landeo y Jaime Ruiz 193

CAPÍTULO 10

ACTIVACIÓN QUÍMICA DE OVOCITOS DE ALPACAS Y LLAMAS.

Jaime Ruiz y Flor Castañeda..... 217

CAPÍTULO 11

CONOCIENDO A LAS CÉLULAS MADRE ESPERMATOGONIALES DE ALPACA.

Martha Valdivia..... 239

CAPÍTULO 12

PROCESOS DE REPRODUCCIÓN DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS EN EL ECUADOR.

Luis Chicaiza y Edwin Pino 249

Prólogo

Los Camélidos Sudamericanos (CSA), especialmente la alpaca, representa un potencial de desarrollo para la puna, donde viven las comunidades humanas más aisladas y pobres del Perú, en las regiones de Puno, Huancavelica, Junín, Arequipa, Ayacucho y Cusco, entre otras. El manejo de la alpaca, junto al de la vicuña, es una de las pocas posibilidades de mejorar las condiciones de pobreza de estas comunidades, junto con la minería, el turismo y la acuicultura, ya que, en estas zonas de gran altura, la agricultura y la ganadería basada en especies introducidas, son poco viables.

Indudablemente, el valor potencial y las características particulares de la fibra y la carne han sido los principales motivos para la investigación, el estudio y el desarrollo de tecnologías para la producción, durante más de 50 años. Así, los primeros trabajos de inseminación artificial en CSA fueron hechos con semen sin diluir, donde un denominador común fue la carencia de información sobre parámetros fundamentales, volumen y concentración espermática de las dosis de inseminación aplicadas. Los trabajos de transferencia de embriones en CSA domésticos (alpaca y llama) a nivel de Perú se iniciaron en el Centro de Investigación y Producción Quimsachata del INIA el año 2002, conjuntamente con el IVITA de la UNMSM y la UNA La Molina, en el desarrollo de protocolos viables sobre los 4,200 msnm utilizando la gonadotropina coriónica equina (eCG), la hormona folículo estimulante (FSH) y de forma natural.

El presente libro *Biotechnologías Reproductivas en Camélidos Sudamericanos*, contiene los resultados más recientes logrados por los mejores grupos de investigación del Perú, así como de países hermanos como Ecuador, Chile, Argentina, Bolivia y país amigo como Italia, liderado por científicos de amplia trayectoria, los cuales representan grandes esfuerzos multidisciplinarios de ingenieros zootecnistas, médicos veterinarios, biólogos y otros profesionales, que buscan comprender cada vez más la compleja y particular biología reproductiva de los Camélidos Sudamericanos, en especial de la alpaca, abarcando aspectos claves referidos al factor inductor de ovulación presente en el plasma seminal de llamas y alpacas, morfogénesis intrauterina temprana del cerebro y caracterización neuroquímica del hipotálamo en el feto de alpaca, análisis de semen asistido por computadora, relación del plasma seminal con los espermatozoides de semen fresco y criopreservado, criopreservación de espermatozoides de llama, transferencia

embrionaria, fecundación *in vitro*, aspiración folicular de ovocitos, vitrificación de ovocitos, activación química de ovocitos, células madre espermatogoniales de alpaca y procesos de reproducción de Camélidos Sudamericanos. En este contexto, cabe resaltar el logro del grupo de investigación que lidera el Dr. William Vivanco, eminente e incommensurable científico ayacuchano, sobre el nacimiento de las primeras crías de alpaca por transferencia de embriones producidos *in vivo* vitrificados.

Estamos conscientes de que toda esta intensa y dinámica actividad científica se desarrolla paralelamente a la existencia de temas de fondo que todavía no han sido resueltos: las alpacas tienen una alta tasa de hibridación por la cual la pureza genética de esta especie está muy deteriorada; persiste todavía el problema de consanguinidad que probablemente se traduce en una considerable frecuencia de defectos de conformación a nivel de aparato reproductor, facial, extremidades, columna vertebral y ubre, bajísima proporción del peso corporal respecto al peso testicular y diversas anomalías genitales, que afectan significativamente el éxito de su reproducción; y el tema de los registros genealógicos inexistentes, que permitirían disponer de machos y hembras de mejor calidad genética para investigación y desarrollo.

Abrigo la esperanza de que en un tiempo más, el destilado de estos invalorable esfuerzos tenga como principales beneficiarios a los productores alpaqueros que viven en los Andes Sudamericanos. Estoy convencido de que la biotecnología ayudará de manera significativa con el mejoramiento genético de la alpaca, permitiendo que la producción alpaquera sea realmente una actividad socioeconómica rentable en condiciones de puna, como es el clamor de organizaciones como la Sociedad Peruana de Llamas y Alpacas (SPAR), el Consejo de Pueblos Criadores de Camélidos del Norte de Ayacucho (COPUCNA) y otras.

Felicito al Dr. Jaime Ruíz, por ser un Ingeniero Zootecnista completo, como investigador, como docente universitario, como gestor de la investigación científica y como difusor permanente de la producción científica nacional e internacional.

Dr. Fidel R. Mujica Lengua
Laboratorio de Biotecnología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga
Ayacucho-Perú

Presentación

Las biotecnologías reproductivas han servido a la mejora genética, rescate y conservación de animales domésticos y silvestres. La inseminación artificial, una revolucionaria técnica de inicios del siglo pasado, ha sido una potente herramienta para el mejoramiento genético en bovinos y ovinos. En camélidos sudamericanos se ha investigado en la aplicación de todas las biotecnologías reproductivas sin embargo ninguna se ha consolidado. La inseminación artificial con semen fresco es una de las biotecnologías reproductivas que más se ha desarrollado, sin embargo, para su masiva utilización por los productores de alpacas y llamas se requiere el desarrollo de la congelación del semen, lo cual no se ha logrado hasta la fecha. Por estos motivos presentamos 4 capítulos relacionados con el semen de los camélidos sudamericanos. En el capítulo 3 se describen estudios sobre la fisiología de los espermatozoides de alpacas, llamas y vicuñas utilizando la tecnología del análisis computarizado del semen. En el capítulo 4 se presenta una detallada revisión realizada por investigadores de la Universidad de Buenos Aires sobre las proteínas del plasma seminal de camélidos sudamericanos y su efecto en espermatozoides frescos y criopreservados. En el capítulo 5 se muestran resultados de investigación sobre el congelamiento de semen de llama realizados en la Universidad Católica Boliviana San Pablo, en donde evaluaron dilutores preparados, métodos de congelamiento y dilutores comerciales sobre la motilidad y vitalidad de espermatozoides antes y después del congelamiento. En el capítulo 12 se presentan resultados de la evaluación de distintos métodos de colección de semen así como protocolos para colección de semen por electroeyaculación en el Ecuador.

En este libro también se presentan resultados de investigación en la producción de embriones *in vivo* e *in vitro*. En el capítulo 6 se explica con mucho detalle los avances en la producción de embriones *in vivo*, se presentan protocolos y resultados de transferencia de embriones en alpacas y llamas superovuladas, asimismo se presentan resultados de la colección de embriones en alpacas y llamas sin superovulación de un celo simple. En el capítulo 7 se presentan los resultados de investigación de la producción de embriones *in vitro* en nuestro país resaltando el significativo aporte del Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica en el desarrollo de esta biotecnología reproductiva, lográndose el nacimiento por primera vez de una llama macho por fecundación *in vitro*. En el capítulo 8 se destacan resultados

de investigación en recuperación de ovocitos de alpacas y llamas vivas, los cuales se pueden utilizar para producir embriones de hembras élite al fecundarlos con semen de machos seleccionados por su mejor finura de fibra, densidad y peso de vellón y de esta forma contribuir al mejoramiento genético. En la Universidad Nacional de Huancavelica se logró por primera vez el desarrollo embrionario hasta blastocito luego de fecundar con semen de epidídimo ovocitos recuperados de alpacas vivas.

En el capítulo 9 y 10 desarrollamos la vitrificación y la activación química de ovocitos, biotecnologías reproductivas trabajadas ampliamente en nuestro laboratorio. En el capítulo 9 se presentan resultados de vitrificación de ovocitos de alpaca utilizando las técnicas de microgotas y cryotech, los ovocitos luego de ser descongelados fueron utilizados para producir embriones y logramos con ambas técnicas el desarrollo hasta blastocisto, demostrando que es factible la producción de embriones a partir de un ovocito vitrificado. En el capítulo 12 también se presentan resultados de vitrificación de ovocitos de llama en Ecuador. En el capítulo 10 se describen distintos métodos que existen para activar ovocitos, se presentan resultados de activación química de ovocitos de alpaca y llama para la producción de embriones partenogénéticos, por transferencia nuclear e ICSI. Asimismo, se presentan resultados de investigación realizados en la Universidad Nacional de Huancavelica, los cuales han permitido identificar un protocolo óptimo para la activación de ovocitos de alpaca, el uso del etanol como alternativa para la activación de ovocitos de alpaca y el uso de la activación química para evaluar la viabilidad de ovocitos de alpaca post vitrificación.

En este libro también se presentan 3 capítulos de temas relacionados con la fisiología reproductiva de los camélidos sudamericanos. En el capítulo 1 se desarrolla el factor inductor de la ovulación presente en el plasma seminal de llamas y alpacas, sabemos que la ovulación es manipulada en los protocolos de inseminación artificial y transferencia de embriones, por lo que luego de su lectura entenderemos mejor los procesos relacionados con la ovulación. En el capítulo 2 proporcionamos la caracterización morfológica y anatómica progresiva del cerebro de alpaca durante el primer trimestre de la preñez. Asimismo, se caracterizan células neuronales que contienen proteínas estratégicas durante la embriogénesis que actúan como moduladores del proceso de diferenciación cerebral, especialmente en el área hipotalámica. Estudios muy importantes para el conocimiento del desarrollo temprano de la alpaca y porque el hipotálamo representa la principal región estratégica del cerebro para el control del comportamiento reproductivo. En el capítulo 11 se evalúan estrategias de identificación de las células madre espermatogoniales mediante marcadores

moleculares y de moléculas de reconocimiento localizados en la superficie de las membranas de estas células. Las células madre espermatogoniales pueden conservar y transmitir información genética a la siguiente generación por lo que identificarlas y conservarlas sería una valiosa herramienta para la conservación biotecnológica de la fertilidad de una especie de importancia comercial, como es el caso de la alpaca.

En este libro logramos la participación de investigadores de todos los países andinos en donde se crían camélidos sudamericanos y de manera especial la participación de colegas de la Universidad de Padova Italia. Por otro lado, quiero agradecer a todos los autores que han contribuido en la presente edición, por el esfuerzo realizado en cada uno de los capítulos que han escrito y por la aceptación para presentarlos en el presente libro. Asimismo, espero que esta publicación sea de suma utilidad a productores, estudiantes y profesionales interesados en camélidos sudamericanos. Finalmente, deseo expresar mi profundo agradecimiento al Ing. Carlos Fernando Herrera Descalzi past Decano Nacional del Colegio de Ingenieros del Perú por permitir el financiamiento de la presente edición como parte de la colección Bicentenario del Perú.

Jaime Antonio Ruiz Béjar
Autor

CAPÍTULO I

EL FACTOR INDUCTOR DE OVULACIÓN PRESENTE EN EL PLASMA SEMINAL DE LLAMAS Y ALPACAS: HISTORIA Y CARACTERIZACIÓN

Mauricio Silva, Jaime Ruiz y Marcelo H. Ratto

RESUMEN

Las alpacas y llamas son especies de ovulación inducida. Los resultados de investigaciones iniciales determinaron que la ovulación sólo ocurre si la hembra recibe la cópula. Sin embargo, en los últimos años se ha descubierto un factor proteico presente en el semen de los camélidos domésticos el cual induce la ovulación y otros estudios demostraron que en llamas y alpacas la administración, tanto intrauterina como parenteral, de este factor inductor de ovulación desencadena un incremento de la concentración sistémica de LH. Sin embargo, se conoce parcialmente como esta molécula ejerce su acción a nivel del eje hipotálamo-hipófisis gonadal. Inicialmente esta molécula fue conocida como factor inductor de la ovulación y a partir del año 2012 se le conoce como OIF/NGF o directamente como factor de crecimiento nervioso tipo β (β -NGF). Se ha demostrado que la monta con intromisión de pene y eyaculación efectiva induce un rápido incremento en la concentración sanguínea de LH, evidenciándose a partir de los 15-30 minutos y alcanzando su máxima expresión 2-3 horas post monta. Similarmente ocurre con la administración de plasma seminal o β -NGF purificado, aumentando la concentración sanguínea de LH la cual está altamente correlacionada con un alza de la concentración de β -NGF a nivel sanguíneo. Este incremento de LH produce ovulación en promedio a las 29.3 ± 0.7 horas de la aplicación de plasma seminal. Asimismo, se ha demostrado en llamas que ovularon producto de la aplicación intramuscular de plasma seminal un incremento en la secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo el cual fue de mayor diámetro y regresionó más tardíamente en comparación con hembras tratadas con GnRH, incluso el cuerpo lúteo secretó más del doble de progesterona que en aquellas tratadas con GnRH. Se ha demostrado

también que el tratamiento con β -NGF induce un cambio en el proceso de esteroidogénesis del folículo preovulatorio de las llamas, observándose un incremento en la regulación de los principales genes relacionados con la producción de progesterona, resultando en un aumento en la relación progesterona/estradiol en el líquido folicular. Asimismo, el tratamiento con β -NGF produce en las llamas un incremento de vascularización del folículo preovulatorio y de los estadios iniciales de desarrollo del cuerpo lúteo. Hace más de 40 años se evidenció la presencia de un factor inductor de la ovulación en semen de camello bactriano y poco más de 15 años se reportó la presencia de este factor en semen de alpacas y llamas, en la última década este factor ha sido identificado como la neurotrofina Factor de Crecimiento Nervioso tipo Beta (β -NGF) en llamas, alpacas y camellos bactrianos, además este factor ya ha sido caracterizado bioquímica y funcionalmente. La fuente principal de OIF/ β -NGF en llamas es la glándula prostática, la concentración de β -NGF es mayor en el semen de llamas que en especies de ovulación espontánea y representa el 50% de la proteína total en el plasma seminal de llama, siendo 10 veces más concentrado que en el semen bovino.

ARCHIVO SOLO PARA USO ACADÉMICO

INTRODUCCIÓN

La ovulación es un proceso fisiológico complejo cuya ocurrencia es determinante para el éxito reproductivo de las distintas especies animales. Aunque aún es un tema de arduo debate, las diversas especies evolutivamente han adaptado una estrategia ovulatoria, la cual se ajusta a sus características e interacciones sociales, su medio ambiente y sus propias particularidades reproductivas (Bakker y Baum 2000).

La ovulación en los mamíferos involucra la secreción pulsátil de GnRH desde el núcleo medio basal del hipotálamo a los capilares del sistema portal hipofisiario, con la consecuente descarga de LH desde los gonadotropos a la circulación general. El incremento de la concentración de LH induce una secuencia de cambios dentro del folículo preovulatorio, que culminan con la ruptura de su pared y la liberación del ovocito conjuntamente con el fluido folicular.

Históricamente las hembras de las distintas especies animales han sido clasificadas, en base al mecanismo de ovulación en 2 grandes categorías: ovuladoras espontáneas e inducidas. En el caso de ovuladoras espontáneas, como las hembras bovinas, ovinas, equinas y porcinas, la liberación de GnRH desde el hipotálamo es inducida cuando, en presencia de bajas concentraciones de progesterona, los niveles sanguíneos de estradiol provenientes de los folículos dominantes sobrepasan cierto umbral. Por otra parte, en hembras ovuladoras inducidas como la coneja, gata, llama y alpaca la secreción de GnRH desde el hipotálamo se desencadena por señales neurales provenientes de la estimulación mecánica que recibe la hembra durante la intromisión peneana en la cópula. Esto finalmente determina la liberación de LH desde la hipófisis y consecuentemente la ovulación.

Aunque el fenómeno de la ovulación inducida ha sido demostrado en llamas, alpacas, camellos bactrianos y dromedarios, los factores relacionados con este mecanismo de ovulación no han sido aún completamente dilucidados. Diferentes estímulos (olfatorios, táctiles, visuales y auditivos) se han asociado con la inducción de la ovulación en hembras de especies ovuladoras inducidas en general y en los camélidos en particular, siendo sin embargo, el estímulo físico de la cópula el factor principal en la inducción de

la descarga preovulatoria de LH (Bakker y Baum 2000). Sin embargo, más allá del estímulo físico, señalado como el desencadenante de la ovulación, las vías neurales a través de las cuales estos estímulos sensoriales asociados a la cópula alcanzan y activan las neuronas liberadoras de GnRH del cerebro anterior en ovuladores inducidos son poco conocidas. A pesar de lo anterior, por muchos años se ha establecido como un dogma que en estas especies la ovulación sólo ocurre si la hembra recibe el estímulo mecánico de la cópula de un macho. Sin embargo, este concepto ha sido cuestionado recientemente debido al descubrimiento de un factor proteico presente en el semen de llamas y alpacas, el cual es un potente inductor químico de la ovulación (Adams et al., 2005).

Aunque ya los estudios pioneros (Adams et al., 2005; Ratto et al., 2005) demostraron que en llamas y alpacas la administración, tanto intrauterina como parenteral, de este factor inductor de ovulación desencadena un incremento de la concentración sistémica de LH, se conoce sólo en forma parcial como esta molécula ejerce su acción a nivel del eje hipotálamo-hipófisis gonadal.

Breve historia del factor inductor de ovulación seminal

La historia del descubrimiento del factor inductor de ovulación en el semen de los camélidos sigue un camino paralelo al de diversos estudios destinados a determinar posibles efectos o condicionamientos del semen o del plasma seminal en el tracto reproductivo de la hembra, o más aún en su fisiología reproductiva (Robertson y Sharkey 2001; Robertson 2007). Producto de estos estudios, hoy se tiene pleno conocimiento de que el plasma seminal, producido por las glándulas accesorias del tracto reproductivo del macho, no sólo cumple funciones de medio de transporte, nutrición y mantención para los espermatozoides, sino que puede además regular importantes funciones reproductivas en la hembra como la sobrevivencia embrionaria, el establecimiento de la gestación y la ocurrencia de la ovulación, a través de la presencia de diversas proteínas, factores de crecimiento, hormonas y citocinas (Robertson 2007). En este sentido, aparte de la inducción de ovulación, se han observado recientemente efectos del factor inductor de ovulación a nivel de la vascularización uterina en llamas (Silva et al., 2017a).

Uno de los primeros estudios que describió el rol del líquido seminal en el control del mecanismo de ovulación fue desarrollado por Chen et al. (1985), reportando que luego de la administración intravaginal de semen de camello Bactriano en hembras de la misma especie, se producía un alto porcentaje de ovulaciones sin que haya existido contacto físico con el macho. Una serie de estudios (ver revisión Adams et al., 2016; Ratto et al., 2019) desarrollados durante los siguientes 15 años, demostraron la existencia de un potente factor inductor de ovulación en el plasma seminal del camello Bactriano, el cual inducía su efecto en las hembras incluso cuando era administrado intramuscularmente. Sin embargo, estos estudios solo lograron purificar y caracterizar parcialmente la molécula, no pudiendo identificarla.

Para el caso de los camélidos sudamericanos, estudios pioneros realizados en Perú por el Dr. Julio Sumar sugirieron que el depósito intra vaginal de semen también se correlacionaba con la ocurrencia de la ovulación en alpacas (Adams GP, comunicación personal); demostrándose posteriormente que el plasma seminal de alpacas estimulaba la secreción de LH en cultivos *in vitro* de células pituitarias de rata (Paolicchi et al., 1999). A partir de estos estudios, diversos grupos de investigación comenzaron a sugerir la presencia del factor inductor de ovulación también en el semen de alpacas y llamas, confirmándose luego en un modelo *in vivo* la asociación entre la administración sistémica de plasma seminal homólogo, en llamas y alpacas, con la secreción de LH y una consecuente alta tasa ovulatoria (Adams et al., 2005).

El factor inductor de ovulación presente en el plasma seminal de llamas y alpacas ha sido identificado como el Factor de Crecimiento Nervioso Beta (β -NGF; Ratto et al., 2012; Kershaw-Young et al., 2012a y b). Esta molécula induce eficientemente la ovulación, a través de la estimulación de la secreción de LH hipofisaria, cuando se administra intramuscularmente a hembras en dosis fisiológicamente relevantes, ósea en concentraciones similares a las encontradas en un eyaculado (Silva et al., 2011a; Tanco et al., 2011; Ulloa-Leal et al., 2014). El efecto ovulatorio del OIF ha demostrado ser dosis dependiente tanto en llamas (Tanco et al., 2011) como en alpacas (Stuart et al., 2015).

Adicionalmente, en llamas (Adams et al., 2005; Silva et al., 2011a y b; Fernández et al., 2014; Ulloa-Leal et al., 2014) pero no así en alpacas

(Kershaw-Young et al., 2012a), se ha descrito que β -NGF presenta un efecto luteotrófico, estimulando una mayor secreción de progesterona por parte del CL inducido luego de su administración.

Dado lo anterior, al revisar la literatura el lector podrá notar que en todos los estudios previos al año 2012 se hace referencia a esta molécula como el factor inductor de ovulación (OIF para su sigla en inglés), para denominarse en trabajos posteriores como OIF/NGF o directamente como Factor de Crecimiento Nervioso Tipo β (β -NGF). Para facilitar la comprensión de la presente revisión se utilizará esta última denominación para referirnos al factor inductor de ovulación.

Efectos endocrinos y ováricos de β -NGF

Efecto ovulatorio:

Estudios pioneros sobre la fisiología reproductiva de llamas y alpacas demuestran que la monta con intromisión peneana y eyaculación efectiva induce un rápido incremento en la concentración sanguínea de LH, el cual comienza a desarrollarse a partir de los 15-30 minutos y alcanza su máxima expresión alrededor de las 2-3 horas post monta (Bravo et al., 1990a y b; Fernández-Baca et al., 1970; Ratto et al 2006).

Cuando se analiza en forma conjunta la tasa ovulatoria obtenida en una serie de experimentos (ver revisión Adams et al., 2016) basados en la administración intramuscular de plasma seminal homólogo (0.5 a 1.0 ml) en llamas y alpacas, se observa que aproximadamente un 95% (33/35) de las hembras ovuló, en comparación a 0% (0/35) en el grupo control (suero salino), lo que demuestra el potente rol ovulatorio del factor proteico presente en el plasma seminal. Cuando se evaluó a través de ultrasonografías repetidas (cada 4 horas) el momento de la ovulación con respecto al momento de la administración del plasma seminal se observó que la ovulación ocurre en promedio a las 29.3 ± 0.7 horas (Adams et al., 2005), lo cual es similar a lo reportado luego de la cópula (30.0 ± 0.5 horas) o del tratamiento con GnRH (29.3 ± 0.6 horas) en llamas (Ratto et al., 2006).

Aunque no ha sido del todo dilucidado, existen claras evidencias de que el mecanismo de acción de β -NGF es a través de una acción central (Ratto et al., 2005), estimulando directa o indirectamente las neuronas secretoras de GnRH a nivel hipotalámico (Silva et al., 2011a) más que una acción local a nivel

folicular. Lo anterior fue demostrado al bloquear los receptores GnRH a nivel hipofisario mediante la administración de un antagonista por competición de esta molécula (Cetrorelix, Serono, Chile), observando que esto anula por completo el efecto ovulatorio de la administración exógena tanto de GnRH como de OIF purificado en llamas (Silva et al., 2011a). En forma adicional, también hay antecedentes generados *in vitro* que demuestran que el factor inductor de ovulación puede estimular la secreción de LH desde cultivos primarios de gonadotropos de llamas (Bogle et al., 2012).

Dentro de las 2-3 horas posteriores a la administración de plasma seminal (Adams et al., 2005) o β -NGF purificado (Silva et al., 2011a; Berland et al., 2016) se produce un incremento significativo en la concentración sanguínea de LH. Este aumento comienza a evidenciarse ya a partir de los 30 minutos post-tratamiento (Adams et al., 2005; Silva et al., 2011a) en forma similar a lo descrito para los efectos de la monta natural en llamas. Curiosamente, una de las características que ha llamado la atención desde el desarrollo de los primeros experimentos ejecutados para evaluar el potencial ovulatorio del plasma seminal en llamas y alpacas (Adams et al., 2005; Ratto et al., 2005; Silva et al., 2011a y b) es que la curva de incremento de LH post tratamiento tiende a ser mayor y de una persistencia más prolongada que la inducida con GnRH.

Interesantemente el incremento de LH sanguíneo está altamente correlacionado con un alza de la concentración de β -NGF a nivel sanguíneo, el cual se produce alrededor de 1 hora posterior al tratamiento intrauterino con este factor (Berland et al., 2016). La modulación parcial de la acción de β -NGF por parte de la concentración de estradiol circulante (Silva et al., 2012a) refuerza la hipótesis de que la acción de este factor involucra a las neuronas GnRH hipotalámicas. Por otra parte, la similar respuesta ovulatoria dosis-dependiente observada en llamas luego de la administración tanto de β -NGF (Tanco et al., 2011) como de GnRH (Silva et al., 2012b), refuerza aún más este concepto.

Adicionalmente, diversos estudios han demostrado que la ruta de administración (intramuscular, intrauterina y endovenosa) afecta la respuesta ovulatoria tanto en llamas como alpacas (Adams et al., 2005; Ratto et al., 2005; Silva et al., 2015). Estudios recientes han sugerido que un incremento sustantivo en la dosis de β -NGF (10-20 mg) es requerido al utilizar la vía intrauterina para obtener respuestas ovulatorias comparables

a las obtenidas con 1.0-0.5 mg de β -NGF por la vía intramuscular (Silva et al., 2015), instalándose el concepto de “dosis sistémica de β -NGF”, que refleja la cantidad efectivamente absorbida desde la mucosa genital hacia circulación general (Adams et al., 2016) luego del depósito intrauterino o la cópula.

Efecto Luteotrófico:

Junto con el potente efecto inductor de la ovulación en llamas y alpacas, se ha demostrado que β -NGF estimula un incremento en la secreción de progesterona por parte del CL en llamas, en comparación a hembras tratadas con GnRH (Adams et al., 2005; Silva et al., 2011a y b; Ulloa-Leal et al., 2014). Estudios iniciales en llamas demostraron que aquellas hembras que ovularon luego de ser tratadas intramuscularmente con una dosis de plasma seminal (1 ml) desarrollaron un CL que tendió a ser de mayor diámetro y a regresar en forma más tardía comparativamente con hembras a las cuales se les indujo la ovulación con GnRH (Adams et al., 2005); sin embargo, lo sorprendente fue que en las hembras tratadas con plasma seminal, el CL secretó más del doble de la progesterona que en aquellas tratadas con GnRH. Aunque en menor escala, esta tendencia ha sido corroborada por otros trabajos desarrollados en llamas (Silva et al., 2011a y b; Ulloa-Leal et al., 2014). En contraposición, el efecto luteogénico del β -NGF no ha sido observado en alpacas (Kershaw-Young et al., 2012a).

En base a los resultados de evaluaciones endocrinas realizadas en diversos estudios (Adams et al., 2005; Fernández et al., 2014; Ratto et al., 2011; Silva et al., 2011a; 2014; Tanco et al., 2011; Ulloa-Leal et al., 2014) en los cuales se ha evaluado el efecto de la administración de plasma seminal de llamas o β -NGF aislado y purificado desde el plasma seminal de machos de esta especie, se ha planteado la hipótesis de que el efecto luteotrófico de β -NGF estaría relacionado con el patrón de secreción de LH que induce esta proteína seminal, dado que comparativamente con la curva de incremento de LH inducida por GnRH, es de mayor magnitud y persistencia, lo cual sugiere a la vez una mayor prolongación del estímulo luteotrófico.

Recientemente, se ha demostrado que tanto la cópula como el tratamiento sistémico con β -NGF induce un cambio en el proceso de esteroidogénesis del folículo preovulatorio de las llamas, pasando rápidamente de la producción de estradiol a la de progesterona (Valderrama et al., 2019). En estas hembras se observó un incremento en la regulación de los principales genes relacionados con la producción de progesterona, resultando en un aumento en la relación

progesterona/estradiol en el líquido folicular (Valderrama et al., 2019). El cambio observado en la expresión de genes que controlan los patrones de producción de la esteroidogénesis fue mucho mayor en estas hembras en comparación a aquellas tratadas con GnRH (Valderrama et al., 2019). Por otra parte, en el tejido luteal de hembras inducidas a ovular mediante la administración parenteral de β -NGF también se ha observado un incremento en la expresión de los RNAm de las enzimas p450_{scc} y StAR los días 4 y 8 del desarrollo del CL, lo que determinó un incremento en la concentración plasmática de progesterona en estas hembras (Silva et al., 2017b).

Adicionalmente, estudios basados en el uso de ecografía Power-Doppler, sugieren que el efecto luteotrófico de β -NGF, está directamente asociado a un incremento de vascularización del folículo preovulatorio y de los estadios iniciales de desarrollo del CL en llamas (Ulloa-Leal et al., 2014; Fernández et al., 2014). En estos estudios, llamas tratadas con β -NGF en comparación con hembras del grupo control (GnRH), presentaron un mayor flujo sanguíneo en la pared del folículo preovulatorio tan rápido como 4 horas post tratamiento, además, en ellas se observó una mayor área de vascularización en el CL y una mayor concentración de progesterona plasmática 6 días después de la administración de los tratamientos (Ulloa-Leal et al., 2014).

Se sugieren que el efecto angiogénico de β -NGF puede estar mediado por el incremento del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF por su sigla en inglés), el cual estimula la proliferación endotelial en capilares preexistentes. El efecto angiogénico de β -NGF es altamente relevante, dado que el CL recibe más sangre por unidad de volumen de tejido que cualquier otro órgano del cuerpo. Aunque β -NGF promueve la angiogénesis durante las fases tempranas del desarrollo del CL en llamas, no aumenta el diámetro o peso del cuerpo lúteo, ni tampoco afecta la proporción de células luteales grandes y pequeñas (Ulloa-Leal et al., 2014).

Interesantemente, al administrar β -NGF en un rango de dosis fisiológicamente relevante (de 500 a 125 μ g de β -NGF, correspondiente al 1/25 y 1/200 de la cantidad total presente en un eyaculado) el efecto luteotrófico de esta molécula es altamente dosis-dependiente (Tanco et al., 2011). Por otra parte, el efecto luteotrófico de β -NGF es también influenciado por el momento de administración de su tratamiento. Así, dos dosis administradas antes de y al momento de la ovulación indujeron el desarrollo de un CL más grande y con mayor área de vascularización, lo que produjo una mayor concentración de

progesterona plasmática en esas hembras, comparativamente con hembras tratadas solo con una dosis antes del momento de la ovulación (Fernández et al., 2014). Adicionalmente, ha sido demostrado que el efecto luteotrófico de β -NGF es independiente del diámetro del folículo preovulatorio (Silva et al., 2014), pero dependiente de la dosis de β -NGF y de la frecuencia de administración (antes, durante o después) con respecto al momento de la ovulación (Fernández et al., 2014).

Aislamiento, purificación e identificación del OIF: De Factor Inductor de la Ovulación a Factor de crecimiento Nervioso tipo Beta (β -NGF)

La identificación de β -NGF en el semen de la mayoría de las especies de camélidos se logró luego de una prolongada etapa de experimentación, en la cual muchos intentos de purificación y aislación se desarrollaron tratando de identificar a esta molécula.

Varios estudios chinos documentaron la primera evidencia de la presencia de un factor inductor de la ovulación (OIF) en el semen del camello bactriano hace 40 años. Basado en los resultados de estos estudios, se concluyó que: a) una molécula proteica presente en el plasma seminal era responsable de provocar la ovulación en lugar de la estimulación mecánica o física del pene durante la cópula (Chen et al., 1983; 1985); b) la ovulación inducida por la administración sistémica o intrauterina del factor era precedida por una alza preovulatoria de LH (Xu et al., 1985) y c) el factor era una proteína nueva químicamente diferente a GnRH, LH, hCG, eCG y PGF 2α (Pan et al., 2001). Sin embargo, todos estos estudios no lograron aislar, purificar e identificar este factor del plasma seminal del camello bactriano, quedando su identidad aún como una gran interrogante.

Así, un estudio realizado años después en Camélidos Sudamericanos (Adams et al., 2005) específicamente en alpacas y llamas, también documentó la presencia de OIF en el semen de estas especies, demostrando que la administración sistémica de plasma seminal homólogo indujo la ovulación en 28 de 30 hembras tratadas. De hecho, al igual que en los estudios de camellos bactrianos, la ovulación era precedida por un alza preovulatoria de LH (Adams et al., 2005). Desde entonces, las llamas y las alpacas han surgido como un poderoso modelo animal para estudiar la presencia de

OIF utilizando plasma seminal homólogo o heterólogo (Adams et al., 2005; Ratto et al., 2005; 2006; Bogle et al., 2011), fracciones seminales (Ratto et al., 2010; 2011) o OIF purificado (Tanco et al., 2011; Silva et al., 2011a; Ulloa-Leal et al., 2014) después de la administración intramuscular, intravenosa o intrauterina. Dentro de la última década, este factor ha sido identificado como la neurotrofina Factor de Crecimiento Nervioso tipo Beta (β -NGF) en llamas, alpacas y camellos bactrianos (Ratto et al., 2012; Kershaw-Young et al., 2012a; Druart et al., 2013; Kumar et al., 2013). Además, durante los últimos 10 años este factor se ha caracterizado bioquímica y funcionalmente (ver revisión Adams et al., 2016).

Con base en estos estudios se ha podido establecer que esta molécula posee una potente acción ovulatoria en alpacas y llamas y además tiene un efecto luteotrófico relevante en llamas (Adams et al., 2005; Silva et al., 2011a; Tanco et al., 2011), aunque no se ha observado un efecto luteotrófico similar en alpacas (Kershaw- Young et al., 2012a y b).

Fuente de producción y abundancia de OIF/ β -NGF en el semen de las llamas

La fuente principal de OIF / β -NGF en llamas es la glándula prostática (Bogle et al., 2018), la única glándula sexual accesoria junto a la glándula bulbouretral en llamas macho. Es bien sabido que la concentración de β -NGF en el plasma seminal de las llamas es mucho mayor que la de las especies de ovulación espontánea [(semental y verraco (Bogle et al., 2011); toro (Ratto et al., 2006)]. Además, se encontró que la concentración de β -NGF es alta en el plasma seminal de otro ovulador inducido, como el conejo (Silva et al. 2011b; Maranesi et al., 2015; 2018). Otros estudios demostraron que el β -NGF representa aproximadamente el 50% de la proteína total en el plasma seminal de llama (12.4 mg/ml; Ratto et al., 2011; Tanco et al., 2011), siendo 10 veces más concentrado que en el semen bovino (Bogle et al., 2018). Además, el β -NGF se ha descrito como una de las proteínas seminales más abundantes en las alpacas (Kershaw-Young et al., 2012; Druart et al., 2013), y representa el 15-30% del contenido proteico total del líquido seminal en esta especie (Kershaw-Young et al., 2012a y b).



Figura 1. A la izquierda vagina artificial armada para la colecta de semen y a la derecha colecta de semen de una llama macho utilizando un maniquí.



Figura 2. En ambas imágenes se observa en el tubo colector el semen obtenido de una llama macho.



Figura 3. Primer paso de purificación de semen de llama utilizando una columna de hidroxil apaptite por gravedad.



Figura 4. Segundo Paso de purificación utilizando filtración en gel con una columna de Sephacryl 100/200 conectada a un equipo computarizado de FPLC (Fast Protein liquid Chromatography).

CONCLUSIONES

Basados en las evidencias obtenidas hasta la fecha podríamos señalar que la neurotrofina OIF/ β -NGF es una proteína abundante en el plasma seminal de llamas y alpacas responsable de inducir la ovulación en estas especies. Si bien las llamas y alpacas son animales de ovulación inducida, es decir, requieren de la cópula para inducir la ovulación, se ha descubierto que es la neurotrofina la principal molécula en inducir este proceso y no el contacto físico del pene con el tracto reproductivo de la hembra lo que se había pensado por muchos años.

Por otra parte, cabe destacar el poderoso efecto luteotrófico puesto que hembras tratadas con este factor desarrollan cuerpos lúteos más grandes y con mayor funcionalidad al compararlos con aquellos inducidos con agonistas de GnRH.

Sabemos también que los efectos de NGF sobre la secreción o la inducción del alza de LH es ocasionada a nivel central ya sea directamente o a través de una red interneuronal con efecto directo en las neuronas de GnRH.

Si bien esta molécula ha sido también encontrada en el plasma seminal de ovuladores espontáneos tales como bovino, porcino y equino, su efecto en el tracto reproductivo de las hembras todavía no está totalmente dilucidado en estas especies.

Finalmente, más estudios son necesarios para clarificar el mecanismo completo por el cual este factor afecta al sistema nervioso central para desencadenar el proceso de secreción de GnRH/LH y posterior ovulación en camélidos y también como este factor regularía la función ovárica y endometrial en llamas y alpacas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams GP, Ratto MH, Huanca W, Singh J. Ovulation inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biol Reprod* 2005;73:452-7.
- Adams GP, Ratto MH, Silva ME, Carrasco RA. Ovulation-inducing factor (OIF/NGF) in seminal plasma: A review and update. *Reprod Domest Anim* 2016;51:4-17.
- Bakker J, Baum MJ. Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. *Front Neuroendocrinol* 2000;21:220-62.
- Berland MA, Ulloa-Leal C, Barría M, Wright H, Dissen GA, Silva ME, et al. Seminal plasma induces ovulation in llamas in the absence of a copulatory stimulus: role of nerve growth factor as an ovulation-inducing factor. *Endocrinology* 2016;157:3224-32.
- Bogle OA, Ratto MH, Adams GP. Evidence for the conservation of the biological activity of ovulation-inducing factor in seminal plasma. *Reproduction* 2011;142:277-83.
- Bogle OA, Ratto MH, Adams GP. Ovulation-inducing factor (OIF) induces LH secretion from pituitary cells. *Anim Reprod Sci* 2012;133:117-22.
- Bogle OA, Carrasco RA, Ratto MH, Singh J, Adams GP. Source and localization of ovulation-inducing factor/nerve growth factor in male reproductive tissues among mammalian species. *Biol Reprod* 2018;99:1194-204.
- Bravo PW, Fowler ME, Stabenfeldt GH, BL Lasley. Ovarian follicular dynamics in the llama. *Biol Reprod* 1990a;43:579-85.
- Bravo PW, Fowler ME, Stabenfeldt GH, BL Lasley. Endocrine responses in the llama to copulation. *J Reprod Fertil* 1990b;33:891-9.
- Chen BX, Yuen ZX, Pan GW, Huang YM, Gao YH. Studies on the ovulation mechanism on the Bactrian camel. II. The role of semen in induction of ovulation. *Acta Vet Zootech Sin* 1983;14:161-66.
- Chen BX, Yuen ZX, Pan GW. Semen-induced ovulation in the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *J Reprod Fertil* 1985;73:335-9.
- Druart X, Rickard JP, Mactier S, Kohnke PL, Kershaw-Young CM, Bathgate R, et al. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *J Proteomics* 2013;91:13-22.
- Fernandez-Baca S, Madden DHL, C Novoa. Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca. *J Reprod Fertil* 1970;22: 261-7.

- Fernandez A, Ulloa-Leal C, Silva M, Normabuena C, Adams GP, Guerra M, Ratto MH. The effect of repeated administration of llama ovulation-inducing factor (OIF/NGF) during the periovulatory period on corpus luteum development and function in llamas. *Anim Reprod Sci* 2014;149:345-352.
- Kershaw-Young CM, Druart X, Vaughan J, Maxwell WMC. β -Nerve growth factor is a major component of alpaca seminal plasma and induces ovulation in female alpacas. *Reprod Fertil Dev* 2012a;24:1093-7.
- Kershaw-Young CM, Maxwell WMC. Seminal plasma components in Camelids and comparisons with other species. *Reprod Domest Anim* 2012b;47 (Suppl 4): 369- 75.
- Kumar S, Kumar-Sharma V, Singh S, Hariprasad GR, Mal G, Srinivasan A, et al. Proteomic identification of camel seminal plasma: Purification of β -nerve growth factor. *Anim Reprod Sci* 2013;136:284-95.
- Maranesi M, Zerani M, Leonardi L, Pistilli A, Arruda-Alencar J, Stabile AM, et al. Gene expression and localization of NGF and its cognate receptors NTRK1 and NGFR in the sex organs of male rabbits. *Reprod Domest Anim* 2015;50:918-25.
- Maranesi M, Petrucci L, Leonardi L, Piro F, García-Rebollar P, Millán P, et al. New Insights on a NGF-mediated pathway to induce ovulation in rabbits (*Oryctolagus Cuniculus*). *Biol Reprod* 2018; 98: 634-43.
- Pan G, Chen Z, Liu X, Li D, Xie Q, Ling F, Fang L. Isolation and purification of the ovulation-inducing factor from seminal plasma in the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Theriogenology* 2001; 55: 1863-79.
- Paolicchi F, Urquieta B, Del Valle L, Bustos-Obregon E. Biological activity of the seminal plasma of alpacas: stimulus for the production of LH by pituitary cells. *Anim Reprod Sci* 1999;54:203-10.
- Ratto MH, Huanca W, Singh J, Adams GP. Local versus systemic effect of ovulation- inducing factor in the seminal plasma of alpacas. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:29-44.
- Ratto MH, Huanca W, Singh J, Adams GP. Comparison of the effect of ovulation- inducing factor (OIF) in the seminal plasma of llamas, alpacas and bulls. *Theriogenology* 2006;66:1102-6.
- Ratto MH, Huanca W, Adams GP. Ovulation-inducing factor: a protein component of llama seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;8:44.

- Ratto MH, Delbaere LTJ, Leduc YA, Pierson RA, Adams GP. Biochemical isolation and purification of ovulation-inducing factor (OIF) in seminal plasma of llamas. *Reprod Biol Endocrin* 2011;9:24.
- Ratto MH, Leduc Y, Valderrama XP, van Straaten K, Delbaere L, Pierson R, Adams GP. The Nerve of Ovulation Inducing Factor. *PNAS* 2012;109:15042-7.
- Ratto MH, Berland M, Silva M, Adams GP. New insights of the role of β -NGF in the ovulation mechanism of induced ovulating species. *Reproduction* 2019;157:R199-R207.
- Robertson SA. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. *J Anim Sci* 2007;85(Suppl):36-44.
- Robertson SA, Sharkey DJ. The role of semen in the induction of maternal immune tolerance to pregnancy. *Semin Immunol* 2001;13:243-254.
- Silva ME, Smulders JP, Guerra M, Valderrama XP, Letelier C, Adams GP, Ratto MH. Cetrorelix suppresses the preovulatory LH surge and ovulation induced by ovulation-inducing factor (OIF) present in llama seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol* 2011a;9:74.
- Silva M, Niño A, Guerra M, Letelier C, Valderrama XP, Adams GP, Ratto MH. Is anovulation-inducing factor (OIF) present in the seminal plasma of rabbits? *Anim Reprod Sci* 2011b;127:213-21.
- Silva ME, Recabarren MP, Recabarren SE, Adams GP, Ratto MH. Ovarian estradiol modulates the stimulatory effect of ovulation-inducing factor (OIF) on pituitary LH secretion in llamas. *Theriogenology* 2012a;77:1873-82.
- Silva ME, Colazo MG, MH Ratto. GnRH dose reduction decreases pituitary LH release and ovulatory response but does not affect corpus luteum (CL) development in llamas. *Theriogenology* 2012;77:1802-10.
- Silva M, Ulloa-Leal C, Norambuena C, Fernández A, Adams GP, Ratto MH. Ovulation-inducing factor (OIF/NGF) from seminal plasma origin enhances corpus luteum function in llamas regardless the preovulatory follicle diameter. *Anim Reprod Sci* 2014;148:221-7.
- Silva M, Fernández A, Ulloa-Leal C, Adams GP, Berland MA, Ratto MH. LH release and ovulatory response after intramuscular, intravenous, and intrauterine administration of β -nerve growth factor of seminal plasma origin in female llamas. *Theriogenology* 2015;84:1096-102.

- Silva M, Urra F, Ulloa-Leal C, Ratto MH. A comparative study of the effects of intramuscular administration of gonadorelin, mating and intrauterine infusion of either raw seminal plasma or seminal plasma purified β -NGF on luteal development in llamas. *Reprod Domest Anim* 2017a;52:625-631.
- Silva M, Ulloa-Leal C, Valderrama XP, Bogle OA, Adams GP, Ratto MH. Nerve Growth Factor from seminal plasma origin (sp β -NGF) increases CL vascularization and level of mRNA expression of steroidogenic enzymes during the early stage of Corpus Luteum development in llamas. *Theriogenology* 2017b;103:69-75.
- Stuart CC, Vaughan JL, Kershaw-Young CM, Wilkinson J, Bathgate R, de Graaf SP. Effects of varying doses of β -nerve growth factor on the timing of ovulation, plasma progesterone concentration and corpus luteum size in females alpacas (*Vicugna pacos*). *Reprod Fertil Dev* 2015;27:1181-6.
- Tanco VM, Ratto MH, Lazzarotto M, Adams GP. Dose-response of Females Llamas to Ovulation-inducing Factor From Seminal Plasma. *Biol Reprod* 2011;85:452-6. Ulloa-Leal C, Bogle OA, Adams GP, Ratto MH. Luteotrophic effect of ovulation-inducing factor/nerve growth factor present in the seminal plasma of llamas. *Theriogenology* 2014;81:1101-7.
- Valderrama XP, Goicochea JF, Silva ME, Ratto MH. The effect of seminal plasma β -NGF on follicular fluid hormone concentration and gene expression of steroidogenic enzymes in llama granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2019;17:60.
- Xu YS, Wang HY, Zeng GQ, Jiang GT, Gao YH. Hormone concentrations before and after semen-induced ovulation in the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *J Reprod Fertil* 1985;74:341-6.

CAPÍTULO II

MORFOGÉNESIS INTRAUTERINA TEMPRANA DEL CEREBRO Y CARACTERIZACIÓN NEUROQUÍMICA DEL HIPOTÁLAMO EN EL FETO DE ALPACA

Calogero Stelletta, Jaime Ruiz y Antonella Peruffo

RESUMEN

En este capítulo, proporcionamos la caracterización morfológica y anatómica progresiva del cerebro de alpaca (*Vicugna pacos*) durante el desarrollo temprano. Describimos los aspectos morfológicos de la cabeza y la identificación de las principales estructuras del sistema nervioso central durante el primer trimestre de la preñez.

Se caracterizan las estructuras externas del cuerpo teniendo en cuenta la forma de la cabeza, el desarrollo del primordio óptico, la curvatura dorsal del cuerpo, las yemas de las extremidades, el cordón umbilical y los vasos relativos, y el grosor y la transparencia de la piel (Montelli et al., 2019a).

La topografía y la citoarquitectura de las vesículas prosencefálicas, mesencefálicas y romboencefálicas se describen analizando las secciones sagitales de la cabeza durante el primer trimestre de la gestación. La anatomía del sistema nervioso central (SNC) en crecimiento de este camélido sudamericano presenta muchas similitudes topográficas y estructurales con otras especies de gestación larga (bovina, ovina y humana).

En la segunda parte de este capítulo, se dedica un enfoque especial al área hipotalámica, porque representa la principal región estratégica del cerebro para el control del comportamiento reproductivo. Durante la gestación, el rango de eventos asociados con el desarrollo hipotalámico es el resultado de una cascada de respuestas complejas como la expresión de factores reguladores asociados con la diferenciación neuronal, lo que lleva a definir las regiones hipotalámicas y la formación de los núcleos específicos.

Proporcionamos una caracterización precisa de las células neuronales que contienen las proteínas parvalbúmina (PV), calbindina (CB), calretinina (CR),

la hormona somatostatina (SOM), la enzima aromatasa P450 (P450Arom), el receptor de estrógeno α (ER- α) y el receptor de estrógeno β (ER- β) en el hipotálamo fetal de la alpaca y de la recién nacida (Montelli et al., 2019b). Estos marcadores representan moléculas estratégicas durante la embriogénesis que actúan como moduladores del proceso de diferenciación cerebral, especialmente en el área hipotalámica.

Se ha estimado que en esta especie hasta el 50% de la pérdida embrionaria ocurre durante el primer mes de embarazo (Fernández-Baca et al., 1970). Por lo tanto, se requiere investigación para determinar los factores que tienen mayores probabilidades de contribuir a esta pérdida.

En este concurso, estudiar la morfogénesis intrauterina temprana en la alpaca es estratégico para comprender el crecimiento normal y, en consecuencia, también para reconocer factores de riesgo asociados al mal desarrollo.

Por otro lado, la información morfológica y neuroquímica informada en el presente capítulo contribuye al conocimiento del desarrollo temprano de la alpaca, y puede tener un valor de referencia tanto para los veterinarios como para los científicos biomédicos que investigan el desarrollo embrionario de la alpaca y también las anomalías congénitas.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la morfogénesis en *Vicugna pacos* se hizo más importante en esta especie doméstica, particularmente durante la gestación temprana por dos cuestiones importantes: primero, durante el desarrollo temprano, la pérdida embrionaria en la alpaca puede alcanzar hasta el 50% de las preñeces de alpaca (Bravo et al., 2010), segundo, después de la introducción (Trasorras et al., 2013) y del desarrollo (Landeo et al., 2016; Ruiz et al., 2017) de la producción de embriones *in vitro*, este conocimiento podría aumentar los avances de estas tecnologías reproductivas. Sin embargo, no se sabe mucho sobre la neuroanatomía de esta especie durante la fase de elongación del embrión y el posterior desarrollo fetal.

El período embrionario es el tiempo que transcurre desde la fecundación hasta las primeras etapas del desarrollo de los órganos (aproximadamente 30 días en perros, gatos, ovejas, cerdos, casi 60 días en caballos, vacas, humanos). El embrión de alpaca comienza a elongarse en el día 9-10 y el trofoblasto establece un contacto cercano con el endometrio en el día 12 de la gestación. La implantación comienza en el día 14 y termina aproximadamente el día 22 (Brown, 2000). El período fetal es el tiempo que transcurre entre el período embrionario y el parto (el final de la gestación), durante el cual los órganos crecen y comienzan a funcionar (Pretzer, 2008; Assis Neto et al., 2010; Fletcher y Weber, 2013).

La alpaca es una especie con una gestación considerablemente larga (340 días) y posee un cerebro grencefálico (presenta sulci y gyri). Estas características morfológicas y gestacionales están más cerca de otros Cetartiodactyla, como el cerdo (*Sus scrofa*), bovino (*Bos taurus*), oveja (*Ovis aries*), jirafa (*Giraffa camelopardalis*), (Ballarin et al., 2016; Graic et al., 2017) Además, en función de las características morfológicas de los embriones, es posible enmarcar los diferentes períodos de desarrollo en una clasificación correspondiente, en la medida de lo posible, a las etapas de Carnegie internacionalmente reconocidas (Hill, 2012).

Obtener nuevas ideas sobre el desarrollo del cerebro durante estos períodos importantes es crucial para mapear el crecimiento normal y, en consecuencia, para investigar los mecanismos de los factores de riesgo asociados al mal desarrollo, incluido el parto prematuro y la abiotrofia cerebelosa (Mouser et al., 2009).

Debe considerarse que el hipotálamo es la región cerebral más estratégica involucrada en el control del comportamiento reproductivo (Pfaff et al. 2000) en mamíferos. El estrógeno y sus receptores de estrógeno (RE) tienen un profundo efecto sobre el sistema nervioso e influyen notablemente en la diferenciación sexual del hipotálamo (Gorosito et al. 2008; Schaub et al. 2008; Yamada et al. 2009; Peruffo et al. 2008a) En esta región, un paso importante que ocurre durante el tiempo de gestación es la síntesis local de 17- β estradiol (E2), catalizada por la enzima P450Arom (P450Arom) que desencadena la conversión de testosterona en E2.

El hipotálamo es la principal región del cerebro que expresa P450Arom durante la diferenciación y la distribución topográfica de la enzima, se ha descrito en varias especies de gestación largas, incluidos los ovinos (Roselli y Stormshak, 2012), bovinos (Peruffo et al., 2008a), monos (Roselli y Resko 1986), y en humanos (Montelli et al., 2012). Durante la embriogénesis, los receptores de estrógenos (ER), actúan a nivel celular induciendo la expresión génica y modulando la diferenciación neural (Mermelstein y Micevych, 2008).

Las proteínas de unión al calcio PV, CB y CR son herramientas apropiadas para demostrar cambios en el desarrollo de la organización del cerebro (Ulfig 2002). Estas proteínas están implicadas en una variedad de funciones neuronales, como la diferenciación neuronal, la supervivencia y la muerte. Son marcadores neuroquímicos de tres poblaciones neuronales y, por lo tanto, son útiles para caracterizar clases específicas de neuronas e investigar la citoarquitectura cerebral en diferentes especies (Kim et al., 2016; Yu et al., 2011; Mönkle et al., 2000).

Durante el desarrollo del hipotálamo, la hormona SOM producida por las neuronas neuroendocrinas del núcleo ventromedial ejerce varias acciones que influyen en la sinaptogénesis y la proliferación neural (Goodyer et al., 2004) y regulan los patrones sexualmente dimórficos de la secreción de hormona de crecimiento (GH) (Gillies 1997).

La identificación de las moléculas que regulan el desarrollo de la vesícula diencefálica y su derivado en la alpaca puede contribuir a investigar los mecanismos moleculares asociados a los trastornos relacionados con el hipotálamo específico de la especie.

Morfogénesis temprana de la alpaca (*Vicugna pacos*): características externas y desarrollo cerebral en comparación con la escala progresiva de Carnegie

La morfología de las características externas es crucial para definir la etapa de desarrollo correcta, y luego es posible enfocarse en las estructuras de la cabeza y específicamente en el Sistema Nervioso Central (SNC).

Tabla 1: Resumen de los datos sobre embriones y fetos de alpaca y la etapa correspondiente de Carnegie.

Clasificación	Características Identificadas	Correspondencia a etapa Carnegie	Longitud céfalo – caudal(mm)
Embriones	<ul style="list-style-type: none"> • Foso de la lente y copa óptica • Cuarto ventrículo • Maxilar y mandíbula • Prominencia del corazón • Brotes de extremidades 	13-15	15
Embriones	<ul style="list-style-type: none"> • Placodes sensoriales. • Prominencia del corazón • Brotes de extremidades 	16-17	17
Embriones	<ul style="list-style-type: none"> • Ojo • Prominencia hepática • Rayos digitales, extremidad posterior • Cordón umbilical 	18	23
Fetos	<ul style="list-style-type: none"> • orejas externas • extremidades completas • cuello alargado 	> 23	55

Morfología externa del embrión correspondiente en las etapas Carnegie 13-15

La morfología externa de los embriones (etapas Carnegie 13-15) se caracteriza por la curvatura dorsalmente convexa del tubo neural (Figura 1). Los embriones de alpaca en esta etapa tienen forma de “C” y la longitud céfalo –caudal es de 15 mm. La cabeza es distinta del tronco y el hoyo de la lente es visible. El hígado en desarrollo, la extremidad anterior y el área cardíaca son claramente reconocibles en la sección sagital de todo el embrión (Figura 1). El placode olfativo es visible como un engrosamiento rostral del ectodermo. El placode olfativo forma una invaginación que se convertirá en el hoyo olfativo y dará lugar a la cavidad nasal

y al epitelio olfativo (Figura 1). Los primordios de las yemas de las extremidades aparecen como pequeñas elevaciones de la pared ventrolateral del cuerpo. La piel es delgada y transparente (Figura 2A).

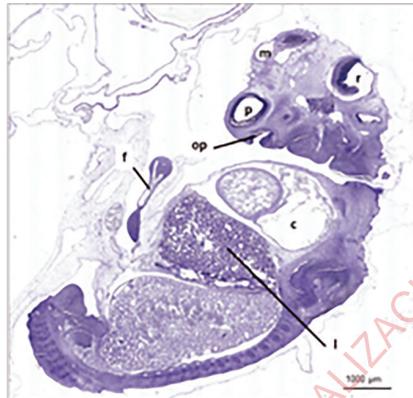


Figura 1: Sección sagital de todo el embrión de alpaca, corresponde aproximadamente a las etapas Carnegie 13-15; mostrando el hígado en desarrollo (l), la extremidad anterior (f) y el área cardíaca (c); el área de la cabeza con la vesícula prosencefálica (p); vesícula mesencefálica (m); vesícula rombencéfalo con la cavidad del cuarto ventrículo (r).

Desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC)

En esta etapa de la gestación, el análisis histológico de secciones sagitales del SNC muestra que las tres vesículas cerebrales primarias ya están presentes (Figura 2B). La vesícula prosencefálica se encuentra en la parte rostral de la extremidad cefálica y el prosencéfalo comienza a diferenciarse. La cavidad del cuarto ventrículo es evidente. Las células de la pared de la vesícula forman tres capas distintivas (Figura 2C). La capa adyacente a la cavidad (zona endimaria) está densamente poblada por células neuroepiteliales. La capa intermedia (capa del manto) está menos poblada y las extensiones citoplasmáticas de las células son visibles. La tercera capa (zona marginal) no tiene cuerpos celulares visibles, pero las extensiones citoplasmáticas de los cuerpos celulares que se encuentran en la zona intermedia son visibles.

La vesícula mesencefálica se ve caudal a la vesícula prosencefálica (Figura 2D). La sección atraviesa las paredes de la vesícula y muestra un área ovalada densamente poblada rodeada por una capa que casi no tiene cuerpos celulares. La vesícula romboencefálica (Figura 2E) presenta una pared celular gruesa en

la parte ventral de la cavidad, mientras que la parte dorsal de la pared de la cavidad es delgada y contiene cuerpos celulares raros.

Dos poblaciones de células neuroepiteliales son visibles en la parte ventral gruesa de la pared de la vesícula. La primera población, que está más cerca del aspecto dorsal de la vesícula, representa el neuroepitelio cerebeloso. La segunda población, que se encuentra en la parte ventrocaudal de la pared, es el neuroepitelio pontino. Las células neuroepiteliales de la vesícula romboencefálica también forman tres capas.

El anlage en forma de abanico del ganglio trigémino en desarrollo, conectado al neuroepitelio pontino, se hace evidente en la parte ventral de la vesícula romboencefálica (Figura 2B). El ganglio está conectado al neuroepitelio pontino de la vesícula romboencefálica por una capa en la que solo son visibles las extensiones citoplasmáticas. Cerca de la vesícula prosencefálica, es visible el hoyo óptico en forma de "C", compuesto por dos capas de células neuroepiteliales con una zona central acelular (Figura 2B). Las dos capas vistas en esta etapa representan la etapa inicial de diferenciación de la retina.

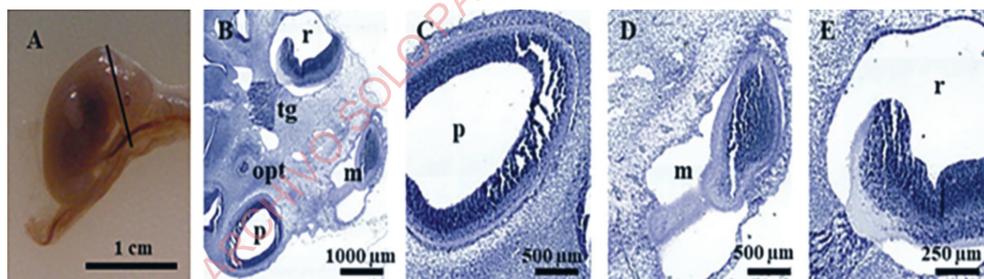


Figura 2: A) embrión de alpaca, de 15 mm de longitud céfalo –caudal que corresponde a las etapas Carnegie 13-15; Vista del lado derecho. B) sección sagital del área de la cabeza con la vesícula prosencefálica (p); vesícula mesencefálica (m); vesícula romboencefálica con la cavidad del cuarto ventrículo (r); ganglio trigémino (tg); copa óptica (opcional). C) detalle de la vesícula prosencefálica (p); D) detalle de la vesícula mesencefálica (m); E) detalle de la vesícula romboencefálica (r).

Morfología externa del embrión correspondiente en las etapas Carnegie 16-17

La morfología externa de los embriones (Carnegie etapas 16-17) se caracteriza por una longitud céfalo –caudal de 17 mm, los embriones están más desarrollados y la morfología externa muestra una curvatura cervical y craneal caudal acentuada.

La piel aún es transparente y el cordón umbilical se encuentra ventralmente en la región de la cola (Figura 3A). El corazón y el hígado son prominentes en el área torácica ventral. Las extremidades torácica y pélvica se alargan distalmente en el plano dorsoventral del embrión, pero aún sin distinción de los rayos de los dígitos (Figura 3A).

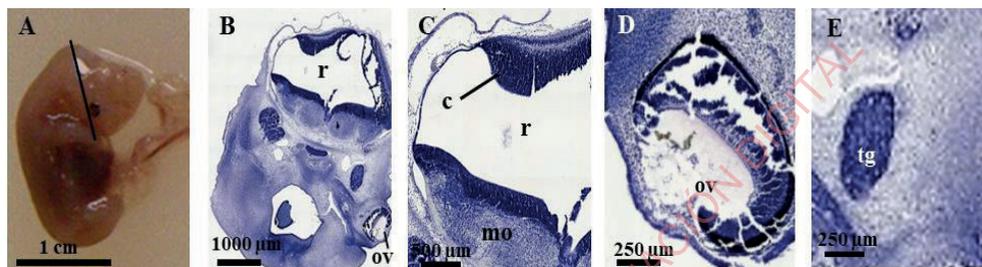


Figura 3: A) embrión de alpaca de 17 mm de longitud céfalo-caudal, que corresponde a las etapas Carnegie 16-17; vista del lado derecho; la línea negra muestra el plano coronal donde se obtuvo la sección. B) Sección coronal del área de la cabeza, que muestra la vesícula romboencefálica (r); vesícula óptica (ov). C) Vesícula romboencefálica (r) que muestra el neuroepitelio cerebeloso (c) y el bulbo raquídeo (mo) en desarrollo. D) la vesícula óptica (ov); E) el ganglio trigémino (tg).

Desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC)

En la región craneal, un desarrollo progresivo de las vesículas encefálicas es visible en las secciones sagitales del SNC en comparación con la etapa anterior. La copa óptica está más diferenciada y muestra un ángulo de la retina.

Las cabezas seccionadas en el plano coronal muestran claramente la cavidad del ventrículo romboencefálico (figura 3B), las paredes del ventrículo están compuestas por pocas capas de células que muestran diversas densidades. En esta área, el neuroepitelio cerebeloso ocupa las paredes laterales del ventrículo. Los diversos núcleos de la protuberancia y el bulbo raquídeo están representados en esta etapa por poblaciones celulares menos densamente agrupadas y agrupadas en el área central (figura 3C). En la vesícula óptica, la copa óptica es evidente, mostrando una doble capa de células dispuestas en forma de "C" donde la capa medial de las células formará la capa pigmentada de la retina mientras que la capa lateral (la que está frente a la cavidad vesicular) dará lugar a los componentes restantes de la parte nerviosa de la retina futura (figura 3D).

Morfología externa del embrión correspondiente en las etapas Carnegie 18

La morfología externa de los embriones (Carnegie etapas 18) se caracteriza por una longitud céfalo-caudal de 23 mm, las regiones del cuerpo están bien definidas, la forma de "C" menos pronunciada, una cola pequeña y definida es visible, y la piel aparece opaca (Figura 4A). Las extremidades torácica y pélvica se diferencian y la rotación y aducción de las extremidades ha comenzado y ventralmente se desplaza la gran inflamación del hígado (Figura 4A). La diferenciación de la cabeza continúa, y el cuello ahora muestra el alargamiento peculiar de los camélidos sudamericanos adultos, sin paralelo por otros mamíferos, excepto la jirafa. Las vesículas ópticas, con una retina pigmentada, son prominentes (Figura 4A).

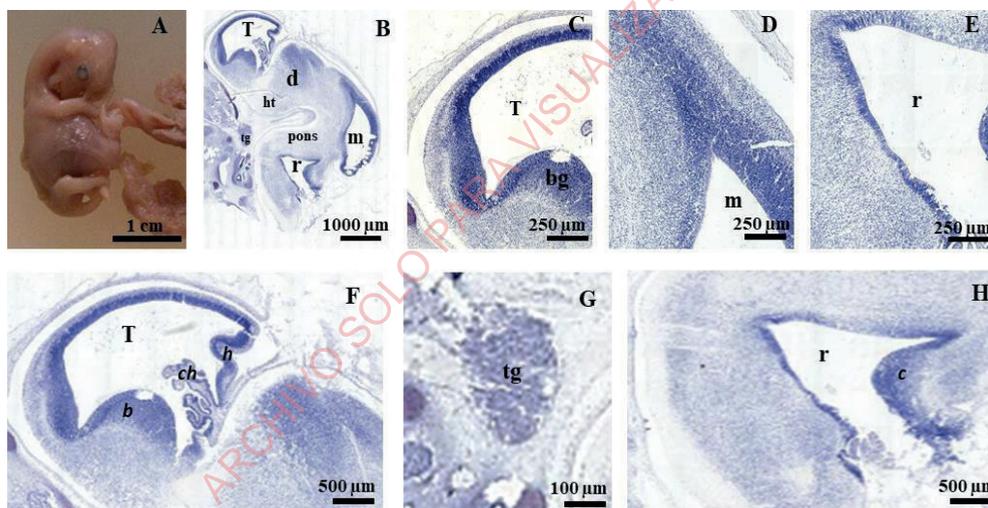


Figura 4: A) embrión de alpaca de 23 mm de longitud céfalo-caudal, que corresponde a las etapas Carnegie 18; Vista del lado derecho. B) Sección sagital del área de la cabeza que muestra la vesícula telencefálica (T); vesícula mesencefálica (m); y vesícula rombencefálica (r). C) Detalle de vesícula telencefálica (T), mostrando el neuroepitelio de los ganglios basales (bg); D) Detalle de la vesícula mesencefálica (m). E) Detalle de vesícula rombencefálica. F) Neuroepitelio de los ganglios basales (b); neuroepitelio del hipocampo (h) y desarrollo del plexo coroideo (ch) del ventrículo telencefálico. G) Mayor aumento del ganglio trigémino (tg). H) Detalle de la vesícula rombencefálica (r) y el neuroepitelio cerebeloso (c) en la cara dorsal de la vesícula rombencefálica.

Desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC)

A esta edad embrionaria, el análisis histológico muestra una definición clara de las vesículas encefálicas y sus respectivas cavidades. En la sección teñida de Nissl de embriones de alpaca en esta etapa (Figura 4B), se ve una de las dos vesículas del telencephalon en la parte superior de la sección. El plexo coroideo en desarrollo es visible sobresaliendo en la luz de la cavidad de la vesícula telencefálica (Figuras 4B, 4C y 4E).

El engrosamiento de la pared vesicular correspondiente a la zona subventricular proliferativa es visible en la parte inferior de la cavidad telencefálica, frente al plexo coroideo. Las células neuroepiteliales de esta área eventualmente formarán la corteza y los ganglios basales (Figura 4D). A la derecha del plexo coroideo, las células neuroepiteliales de la pared ventricular dan origen al hipocampo (Figura 4E). El área celular densa caudal a la vesícula telencefálica corresponde al diencéfalo y las células de esa área darán lugar al tálamo y otras estructuras diencefálicas. La vesícula rombencefálica es visible y ahora es posible distinguir entre las diversas estructuras que se elevan desde el romboencefálico (Figura 4F). El neuroepitelio de la pared ventricular está organizado en una estratificación de tres capas. Parte del neuroepitelio se convertirá en la protuberancia y el bulbo raquídeo. La parte dorsal superior del ventrículo constituye el ángulo del cerebelo (Figura 4H).

El ángulo del ganglio vestibular es visible como un agregado celular cerca de los conductos cocleares. Rostralmente a la flexión pontina, un gran agregado de células corresponde al ángulo del ganglio trigémino (Figura 4L).

Morfología externa del embrión correspondiente en las etapas de Carnegie > 23

La morfología externa de los embriones (etapas Carnegie > 23) se caracteriza por una longitud céfalo-caudal de 55 mm, el feto es significativamente más largo. La piel aparece lisa, pigmentada por un color gris rosado y los vasos sanguíneos superficiales están presentes a lo largo del cuello. La diferenciación de las regiones del cuerpo está completa. Los párpados están formados y cerrados, las pinnas de las orejas bien evidentes. Las extremidades torácica y pélvica están diferenciadas, ambas dotadas de dígitos bien desarrollados. El cuello es más largo que en las etapas de desarrollo anteriores (embrionarias) (Figura 5A).

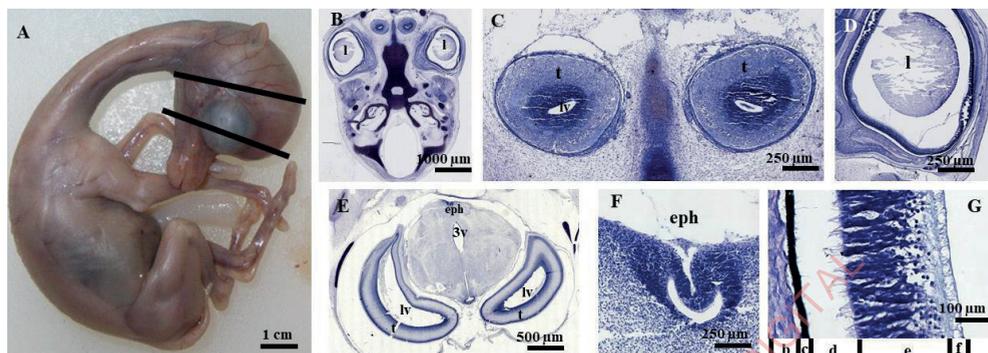


Figura 5: A) Feto de alpaca de presuntos 90 días y 55 mm de longitud céfalo-caudal, que corresponde a las etapas Carnegie 23; vista del lado derecho; Las líneas negras muestran el plano donde se han obtenido las secciones coronales. B) Sección coronal a través de los ojos del área de la cabeza anterior que muestra las vesículas telencefálicas (t) la lente (l) de la vesícula óptica. C) Detalle de la parte anterior de las vesículas telencefálicas (t) que muestra la corteza prefrontal que rodea los ventrículos laterales. D) Detalle de la vesícula óptica. Formación de las nueve capas más internas de la retina formadas a partir de la paredes de la vesícula óptica secundaria. E) sección coronal de la parte posterior del cerebro que pasa a través del diencefalo, mostrando las vesículas telencefálicas (t) y los ventrículos laterales (lv), el tercer ventrículo (3v). F) detalles del epitelio (epi). G) aumento de las capas retinianas en desarrollo: b- coroides, epitelio de pigmento c, ventrículo d-óptico, retina e-sensorial, capa de fibra nerviosa f-óptica y células ganglionares retinianas.

Desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC)

La cabeza se seccionó en dos niveles diferentes, como se muestra en la figura 5A. Las figuras 5B, 5C y 5D muestran secciones de la parte anterior del cerebro. En la sección teñida de Nissl del feto de alpaca en esta etapa (Figura 5B), las dos vesículas del telencephalon correspondientes a la corteza prefrontal se ven en la parte superior de la sección (Figura 5C). Las vesículas ópticas están más diferenciadas, en el ojo son visibles el cristalino y la retina (Figura 5B y 5D). Las capas retinianas en desarrollo son distinguibles: coroides, epitelio pigmentario, ventrículo óptico, retina sensorial, capa de fibra del nervio óptico y células ganglionares retinianas (Figura 5G).

La parte posterior de la cabeza está representada en las Figuras 5E y 5F. En la figura 5E, el diencefalo es evidente entre los ventrículos telencefálicos. El tercer ventrículo es visible y el epitelio en desarrollo (Figura 5F) y el hipotálamo se ven en las partes superior e inferior del diencefalo, respectivamente (Figura 5E).

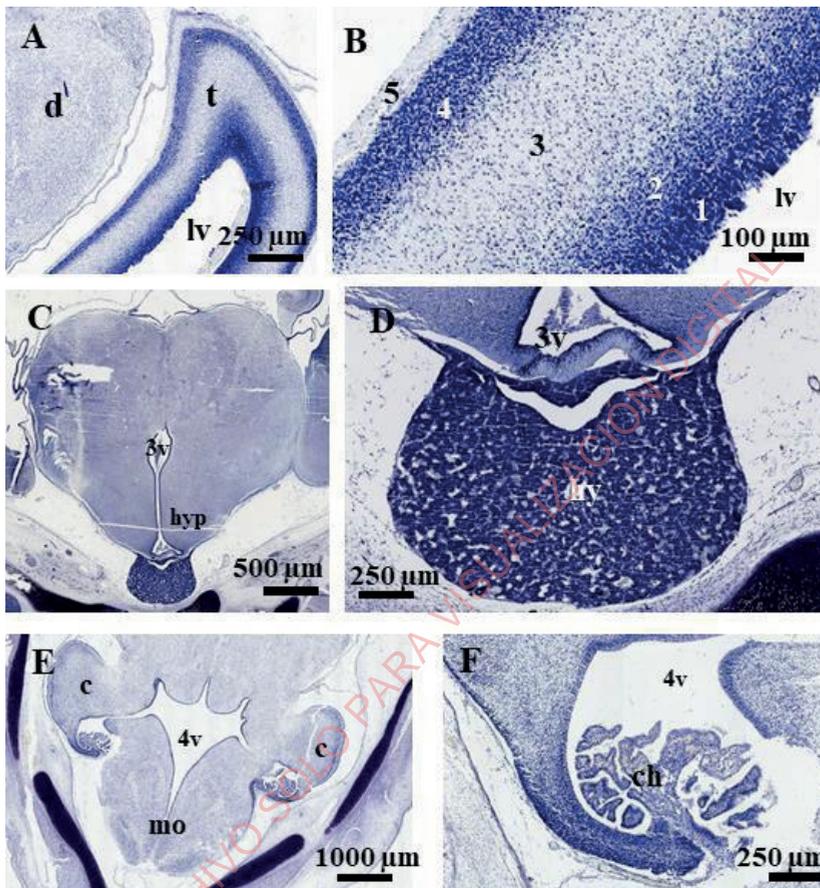


Figura 6: Feto de alpaca de 90 días y 55 mm de longitud céfalo-caudal, que corresponde aproximadamente a la etapa Carnegie > 23. A, B) estratificación en capas de la pared del ventrículo telencefálico (t), 1. Capa interna, 2 segunda capa menos celular, 3. tercera capa que muestra células no tan densamente empaquetadas, 4. cuarta capa compuesta de células densamente empaquetadas, 5. quinta y capa externa compuesta de celdas dispersas. C) área hipotalámica (hyp) que rodea el tercer ventrículo (3V). D) detalle de la glándula pituitaria (hy) conectada a la parte inferior del tercer ventrículo. E, F) detalle del hemisferio cerebeloso (c) y el plexo coroideo (ch) del ventrículo rombencéfalo.

A mayor aumento es posible observar la estratificación del neuroepitelio telencefálico en crecimiento en capas (figura 6A y 6B). La capa interna (en contacto con el ventrículo) está compuesta de células neuroepiteliales con núcleos ovales en una organización pseudocolumna (Figura 6B, capa 1). La segunda capa es menos celular y contiene células con un núcleo redondo (Figura 6B, capa 2). En la tercera capa, las células no están tan densamente juntas y muestran extensiones citoplasmáticas evidentes (Figura 6B, capa 3). La cuarta capa está compuesta de

cuerpos celulares densamente empaquetados con pequeños núcleos redondos (Figura 6B, capa 4). La quinta y la capa externa se componen de un número escaso de células con núcleos pequeños y redondos (Figura 6B, capa 5). La organización de la capa concéntrica de la pared del ventrículo telencefálico representa el proceso de diferenciación y migración del neuroepitelio ventricular en el proceso de formación de la corteza cerebral.

La cavidad del tercer ventrículo está revestida por una capa delgada de células columnares con núcleos ovales (Figura 6C). El hipotálamo se encuentra en la parte inferior, lateral a las paredes del tercer ventrículo y la glándula pituitaria es visible conectada a la parte inferior del tercer ventrículo (Figura 6C y 6D). Las células neurales que rodean el tercer ventrículo están organizadas en grupos, que corresponden a los anales de los núcleos locales en el cerebro adulto. Los hemisferios cerebelosos (Figura 6E) muestran una estratificación en capas en los aspectos laterales.

Caracterización neuroquímica del hipotálamo fetal temprano y de la alpaca (*Vicugna pacos*) recién nacida.

Como en otros mamíferos, el hipotálamo de alpaca se puede dividir (en la dirección anteroposterior) en tres regiones: la región anterior va desde la lámina terminal hasta la cara caudal del quiasma óptico. La porción de la región anterior que es rostral al quiasma óptico también se conoce como región preóptica. La siguiente región que se identifica cuando se procede caudalmente es la región tuberal. Los márgenes de esta región incluyen las áreas que están arriba e incluyen el tuber cinereum. Finalmente, la región posterior se define por el área de arriba e incluye los cuerpos mamilares (Figura 7).

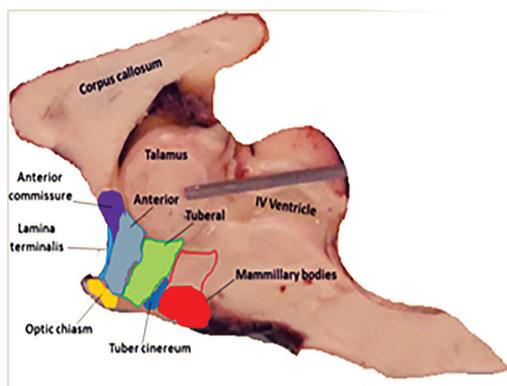


Figura 7: Sección sagital mediana de las regiones hipotálamicas. Los puntos de referencia hipotálamicos son visibles en las superficies ventral y medial (ventricular) del cerebro. El límite rostral visible en la superficie ventral del cerebro está formado por el quiasma óptico (límite amarillo) mientras que los cuerpos mamilares (límite rojo) definen el límite posterior. El hipotálamo se puede dividir en tres partes: área preóptica anterior, hipotálamo medio, incluida la región tubelar, y parte posterior, incluidos los cuerpos mamilares.

La topografía de las regiones hipotalámicas descritas anteriormente y la caracterización anatómica respectiva se muestran en la figura 8. Cada una de las regiones se sub dividen en núcleos agrupados en función de su ubicación en las zonas hipotalámicas. En la figura 8 se muestra una representación esquemática de los núcleos hipotalámicos anterior y tuberal del hipotálamo adulto.

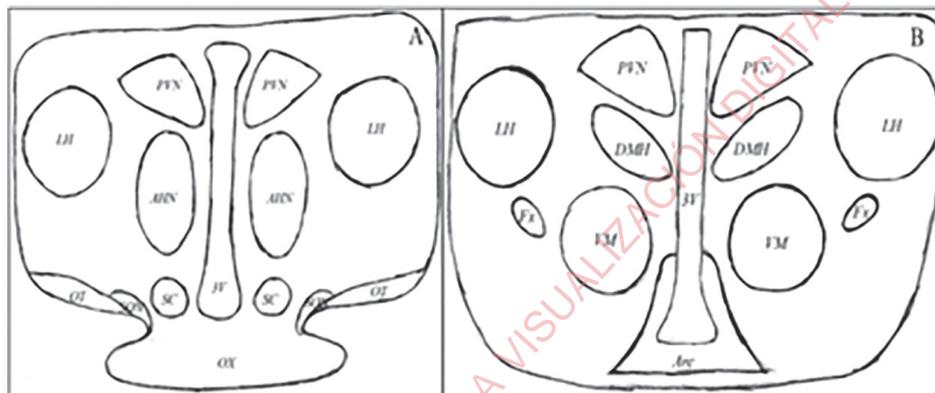


Figura 8: Representación esquemática del área hipotalámica de alpaca. A) sección coronal de la región anterior. B) sección coronal de la región tuberal. Abreviaturas: núcleo hipotalámico anterior (AHN), núcleo arqueado (Arc), núcleo hipotalámico dorsomedial (DMH), fórnix (fx), hipotálamo lateral (LH), tracto óptico (ot), núcleo paraventricular (PVN), núcleo supraquiasmático (SC), núcleo supraóptico (SON), núcleo ventromedial (VMN) y el tercer ventrículo (3V).

El núcleo paraventricular (PVN) se encuentra en la zona periventricular y corre rostro-caudal a través de la parte anterior hacia la región tuberal. El núcleo arqueado (Arc) también tiene una porción ubicada en la zona periventricular, aunque también se extiende lateralmente hacia las zonas medial y lateral que tienen funciones clave en la regulación neuroendocrina. Este núcleo se encuentra en el piso de la región tuberal del hipotálamo. Los núcleos adicionales encontrados en la región anterior de la zona medial incluyen los núcleos supraquiasmáticos (SC) y los núcleos anteriores (AHN). Los núcleos en la región tuberal de la zona medial incluyen los núcleos dorsomediales (DMH) y los núcleos ventromediales (VMN). Finalmente, los núcleos hipotalámicos laterales (LH) se encuentran en la zona lateral de la región anterior y tubular.

Tabla 2: Resumen de los datos sobre embriones de alpaca, fetos y recién nacidos utilizados para el estudio anatómico y neuroquímico del hipotálamo.

Clasificación	Edad fetal (días)	Correspondencia a etapa Carnegie	Longitud céfalo-caudal (mm)
Embriones	20	13-15	15
Embriones	30	16-17	17
Embriones	45	18	23
Fetos	90	> 23	55
Recién nacido	340		

Caracterización inmunohistoquímica del hipotálamo en el embrión de alpaca: etapas 20, 30, 45 días.

La tinción inmunohistoquímica no reveló expresión en las células neuronales para PV, CB, CR, SOM, P450Arom, ER- α o ER- β en el hipotálamo en desarrollo en etapas embrionarias de 20, 30 y 45 días (ver figura 9).

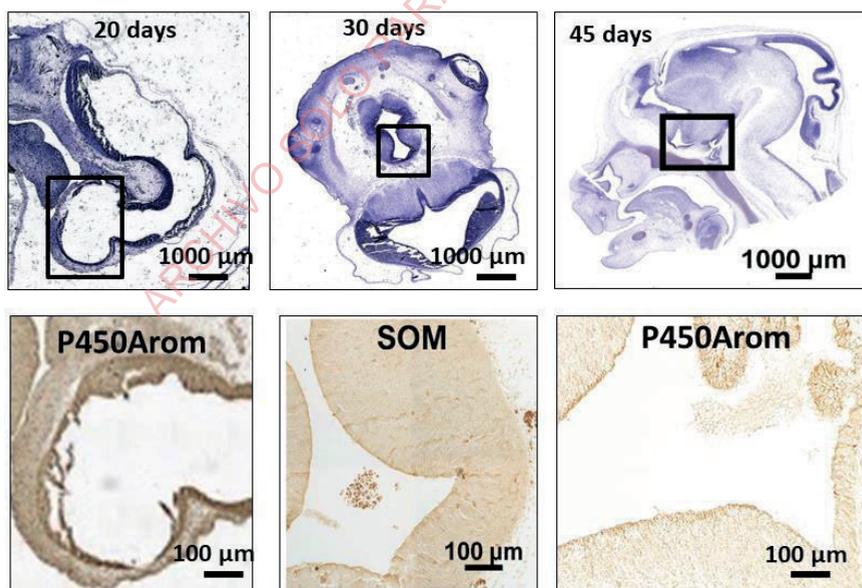


Figura 9: Imagen de inmunohistoquímica durante las etapas embrionarias a los 20, 30 y 45 días para P450Arom y SOM que muestra la ausencia de reactividad. A los 20 días, una sección sagital de la cabeza muestra las tres vesículas cerebrales primarias en desarrollo que ya están presentes; la vesícula prosencefálica se encuentra en la parte rostral de la extremidad céfálica. En la etapa embrionaria 30 días, las cabezas se seccionaron en el plano transversal. La cavidad del ventrículo III es claramente visible. A los 45 días, las cabezas se seccionaron en plano

sagital. La tinción de Nissl muestra una clara definición de las vesículas encefálicas y sus respectivas cavidades. Los cuadrados se centran en la región hipotalámica.

Caracterización inmunohistoquímica del hipotálamo en el feto de alpaca: estadio 90 días.

La tinción inmunohistoquímica está prácticamente ausente para PV, CB, CR, ER- α o ER- β en todos los hipotálamos fetales analizados a los 90 días de gestación. En cambio, los cuerpos y fibras celulares inmunorreactivos a SOM están presentes en la región tuberal (figura 10).

Las neuronas inmunorreactivas al SOM se ubican principalmente en dos áreas: un grupo de células se concentró en el hipotálamo lateral (LH, figura 10A) y un grupo en el núcleo ventromedial (VMN, figura 3B). Las neuronas inmunorreactivas SOM muestran una célula corporal bien teñida y su forma redonda aparece con un proceso inmunorreactivo corto o de forma fusiforme con procesos inmunorreactivos largos. El aspecto general de estas células era el de las neuronas pequeñas con un núcleo débilmente teñido.

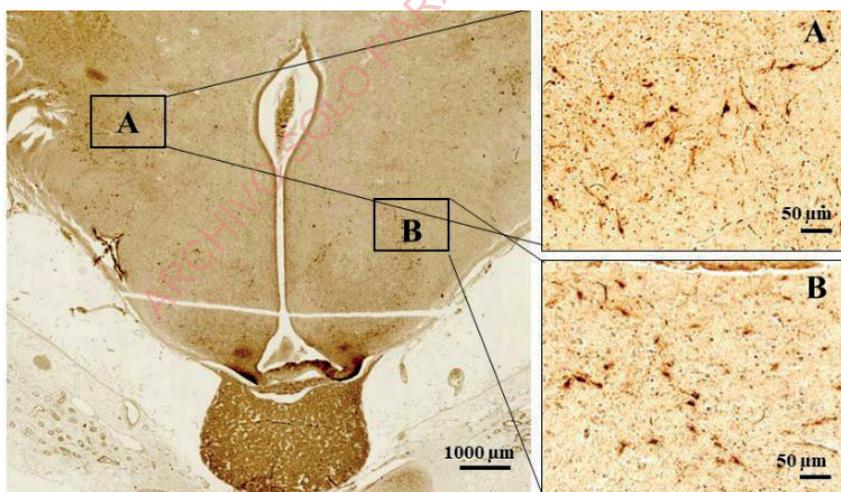


Figura 10: Corte coronal del hipotálamo tuberal de un hipotálamo fetal de alpaca de 90 días. A) área ampliada de las neuronas inmunorreactivas SOM en la LH. B) área ampliada del VMN donde también se ven neuronas positivas para SOM.

Los resultados inmunohistoquímicos para P450Arom revelan numerosas células P450Arom -ir, concentradas en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo dorsal y en el núcleo hipotalámico dorsomedial (DMH) de la región tubular (figura 11). En esta área, P450Arom está presente en el citoplasma de

las células redondas y en forma de huso, concentradas a lo largo del borde del tercer ventrículo (figuras 4A y 4B). No hay P450Arom presente en las fibras o en los axones.

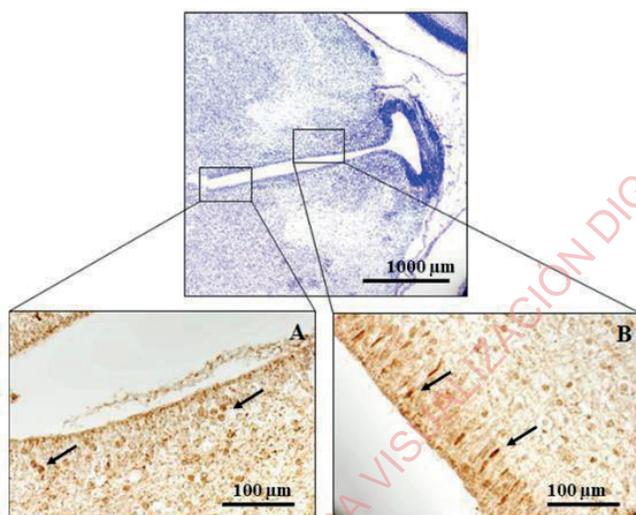


Figura 11: sección teñida de Nissl coronal de la región hipotalámica tubular de un feto de alpaca de 90 días. Los cuadrados representan el área ampliada. A) Las células inmunorreactivas P450Arom están presentes en la parte dorsal del periventricular (PVN). B) Las células inmunorreactivas P450Arom están presentes en el núcleo hipotalámico dorsomedial (DMH).

Caracterización inmunohistoquímica del hipotálamo en la alpaca recién nacida.

En la alpaca recién nacida, todos los neuropéptidos PV, CB, CR, SOM, P450Arom, ER- α y ER- β están presentes en el área hipotalámica.

Las neuronas que contienen PV se distribuyen en la región tubular y anterior, formando grupos de células en la parte dorsal del hipotálamo lateral (figura 12B). Estas neuronas muestran un cuerpo redondo y grande con procesos cortos.

Las neuronas que contienen CB están presentes principalmente en la región hipotalámica del tubo en el área periventricular del DMH (figura 12C) y en el núcleo ventromedial (VMN) (figura 12E). Estas neuronas muestran un perikarya relativamente pequeño con extensiones citoplasmáticas cortas.

Las neuronas que contienen RC están ubicadas en la región tubular dispersa en la parte ventral del hipotálamo lateral (LH), (figura 12D).

En la región hipotalámica tuberal, las células inmunorreactivas a SOM están presentes en el VMN, PVN y en el ARC (figura 12E). En esta área, los cuerpos celulares de SOM-ir eran relativamente pequeños, como se esperaba. Se encontraron fibras largas inmuno-teñidas en toda la parte ventral del tercer ventrículo.

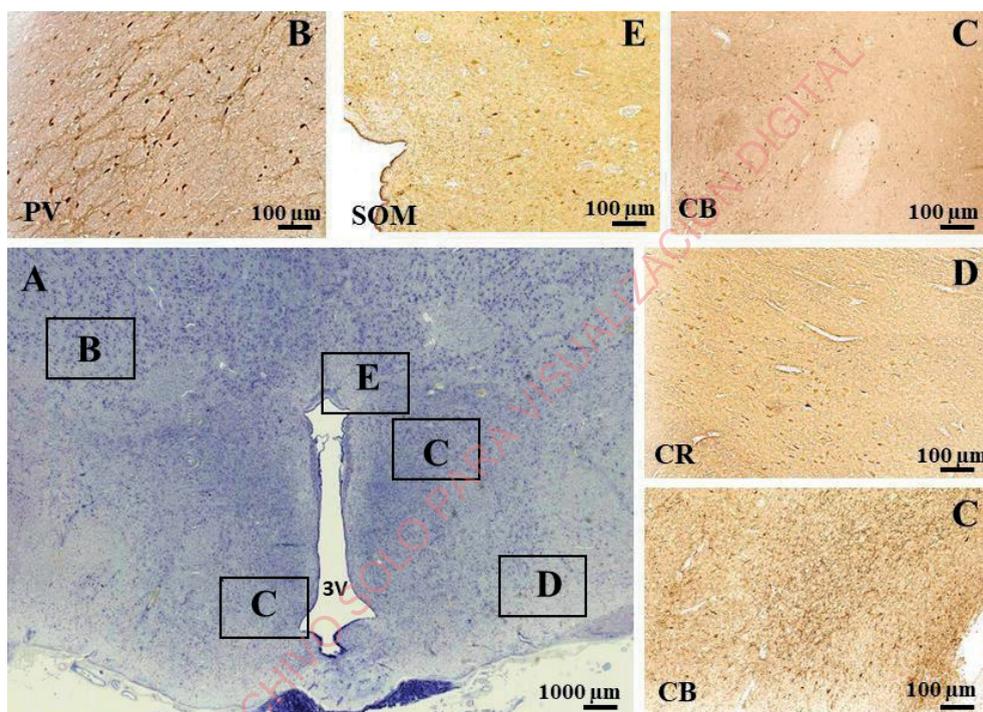


Figura 12: A) Sección de tinción coronal de Nissl de la región hipotalámica tubular de la alpaca recién nacida. Los cuadrados representan áreas ampliadas en B, C, D y E. B) Positividad de PV en la LH. C) distribución de células CB positivas en DMH y VMN. D) distribución de células CR-positivas en la LH. E) distribución de células SOM positivas en el PVN. Tercer ventrículo (3V).

En la región hipotalámica anterior, las neuronas positivas para CB están presentes en la parte ventrolateral del SON, con una distribución simétrica en el núcleo basal de Meynert (figura 13C). Estas neuronas positivas muestran un cuerpo celular relativamente grande y procesos cortos teñidos débilmente. Las células neurales positivas para SOM se extienden en la LH (figura 13 D). Estas células positivas muestran un cuerpo celular relativamente grande con largas extensiones citoplasmáticas.

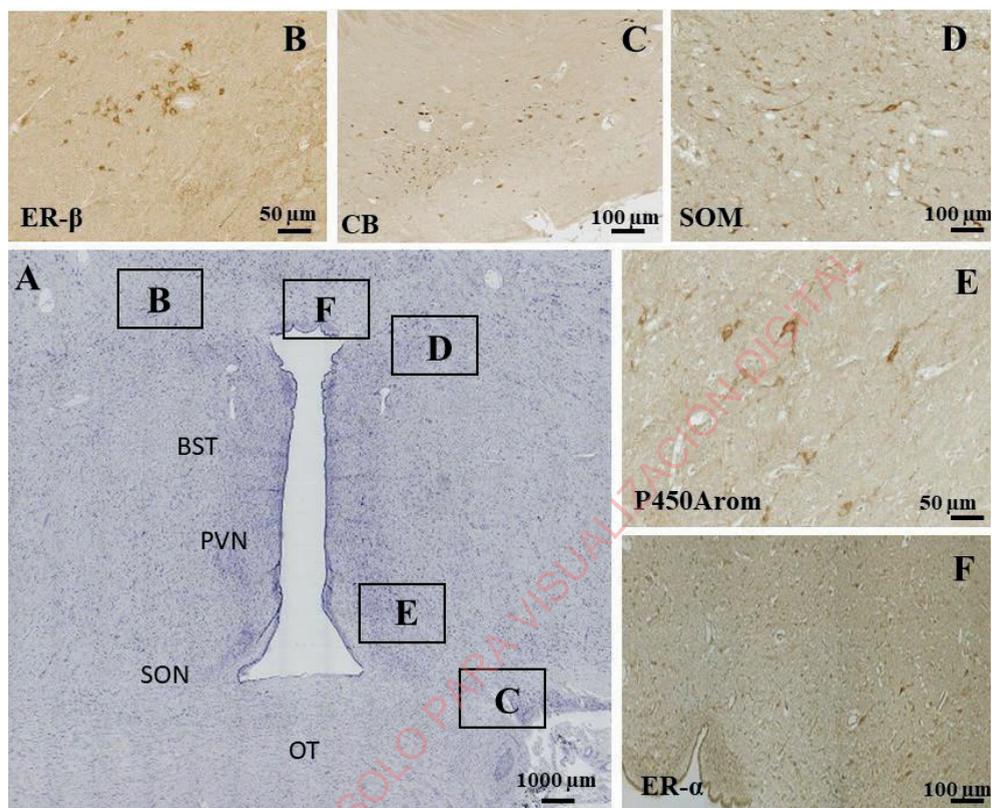


Figura 13: A) Sección de tinción coronal de Nissl de la región hipotalámica anterior de la alpaca recién nacida. Los cuadrados representan áreas ampliadas en B, C, D, E y F. B) distribución de positividad ER- β en la LH. C) distribución de células CB positivas en el SON. D) Positividad de SOM en la LH. E) distribución de células P450Arom-positivas en el área medial. F) distribución de células ER- α -positivas en la parte dorsal de la PVN.

Las células neurales positivas para P450Arom grandes se distribuyen en la parte ventral de la región hipotalámica anterior adyacente al tercer ventrículo en el área SC (figura 13E).

La mayor población de células ER- β positivas está presente en la parte dorsal del hipotálamo (figura 13B). Estas células muestran reactividad en el cuerpo y en los procesos citoplasmáticos.

Las células positivas para ER- α se distribuyen en el PVN del hipotálamo anterior y cerca del techo del tercer ventrículo (figura 13F). Las células positivas eran escasas y la señal se distribuía en el citoplasma y en el núcleo y en el citoplasma de las neuronas.

CONCLUSIONES

El hipotálamo de alpaca, en la etapa embrionaria de 20, 30, 45 días y en los fetos de 90 días de gestación no mostraron células PV-ir, CB-ir y CR-ir. Estos neuropéptidos están presentes en la alpaca recién nacida.

El hecho de que en el hipotálamo no haya neuronas positivas para PV, CB y CR durante la morfogénesis temprana en la alpaca, coincide con lo informado en ovejas, monos y hombres, en el que la inmunorreactividad a PV, CB y CR aparece por primera vez en la semana 9 de gestación (Koutcherov et al., 2002, 2003). Esto puede deberse a la morfología heterogénea de la matriz durante la morfogénesis temprana, en la que la citoarquitectura y la quimio arquitectura del hipotálamo aún no se diferencian en gran medida. La síntesis de CR, CB y más tarde de PV podría vincularse en el proceso de maduración y sinaptogénesis posterior, según lo sugerido para el cerebro de cobaya (Bogus-Nowakowska, 2019).

Las células SOM positivas aparecen tanto en la región hipotalámica anterior como en la tubárica a los 90 días de gestación y en el hipotálamo de la alpaca recién nacida. El aumento de los niveles de SOM puede ser la causa de la caída de la hormona del crecimiento circulante (GH) en el feto en la gestación posterior (Ackland et al., 1983). El tiempo de gestación de la expresión de SOM alrededor del tercer mes también se ha encontrado en el hipotálamo humano fetal (Ackland et al., 1983). Estos datos sugieren una posible cooperación en la regulación de la secreción de GH a través de E2 que involucra SOM en el hipotálamo (Bluet-Pajot et al., 1998; Minami et al., 1998).

Las células P450Arom-positivas están presentes a los 90 días de gestación y en el hipotálamo de la alpaca recién nacida. La enzima P450Arom y la hormona SOM se expresan juntas alrededor del tercer mes de gestación, lo que sugiere una relación funcional de estas moléculas en la regulación de la GH. Un estudio demostró que E2 influye en una población de neuronas que expresan SOM en las áreas diencefálicas parte ventrolateral del VMHvl (Dufourny y Lomet, 2017). Estos hallazgos podrían ser de importancia económica en las especies domésticas de cetartiodactilo, particularmente durante la gestación temprana, cuando la pérdida embrionaria puede alcanzar el 25-40% de las gestaciones de ganado vacuno, ovino y porcino, y hasta el 50% de las gestaciones de alpaca (Bravo et al., 2010).

Las células positivas para ER- α y las células positivas para ER- β están presentes en la región hipotalámica anterior de la alpaca recién nacida. En mamíferos domésticos con un tiempo de gestación prolongado, la expresión de estos RE reveló que en las ovejas ER- α y ER- β se expresan a partir de la segunda mitad de la gestación, y los niveles de ER- β aumentan solo en los días postnatales (Bravo et al., 2008). En la especie *Bos taurus*, la presencia de ER- α y ER- β se reveló en neuronas hipotalámicas en cultivos obtenidos de fetos bovinos de 12 a 17 semanas de gestación (Peruffo et al., 2008b).

La definición de la comunicación cruzada entre PV, CB, CR, P450Arom, SOM y ER en el área hipotalámica, representa una base para futuras investigaciones sobre el hipotálamo de alpaca, la principal región del cerebro estratégica para el control del comportamiento reproductivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackland J, Ratter S, Bourne GL, Rees LH. 1983. Characterisation of immunoreactive somatostatin in human fetal hypothalamic tissue. *Regulatory Peptides*, 5(2): 95–101.
- Assis Neto AC, Pereira FT, Santos TC, Ambrosio CE, Leiser R, Miglino MA. 2010. Morpho-physical recording of bovine conceptus (*Bos indicus*) and placenta from days 20 to 70 of pregnancy. *Reprod Domest Anim*. 45: 760-72.
- Ballarin C, Povinelli M, Granato A, Panin M, Corain L, Peruffo A, Cozzi B. 2016. The Brain of the Domestic *Bos taurus*: Weight, Encephalization and Cerebellar Quotients, and Comparison with Other Domestic and Wild Cetartiodactyla. *PLoS One*. 11(4):e0154580.
- Bluet-Pajot MT, Epelbaum J, Gourdjji D, Hammond C, Kordon C. 1998. Hypothalamic and hypophyseal regulation of growth hormone secretion. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 18(1): 101–123.
- Bogus-Nowakowska K. 2019. Ontogeny of neurons containing calcium binding proteins in the preoptic area of the guinea pig: sexually dimorphic development of calbindin. *Developmental Neurobiology*, 79(2): 175–201.

- Bravo PW, Diaz D, Alarcón V, Ordoñez C. 2010. Effect of the reproductive state of female alpacas on embryonic mortality rate. *American Journal of Veterinary Research*, 71(9): 1096–1099.
- Brown BW. A review on reproduction in South American camelids. 2000. *Anim Reprod Sci*. 58(3-4): 169-95.
- Dufourny L, Lomet D. 2017. Crosstalks between kisspeptin neurons and somatostatin neurons are not photoperiod dependent in the ewe hypothalamus. *General and Comparative Endocrinology*, 254: 68–74.
- Gorosito SV, Lorenzo AG, Cambiasso MJ. 2008. Estrogen receptor alpha is expressed on the cell-surface of embryonic hypothalamic neurons. *Neuroscience*. 154: 1173–1177
- Herrera EA, Reyes RV, Giussani DA, Riquelme RA, Sanhueza EM, Ebensperger G, Casanello P, Méndez N, Ebensperger R, Sepúlveda-Kattan E, Pulgar VM, Cabello G, Blanco CE, Hanson MA, Parer JT, Llanos AJ. 2008. Carbon monoxide: a novel pulmonary artery vasodilator in neonatal llamas of the Andean altiplano. *Cardiovasc Res*. 77(1): 197-201.
- Fernandez-Baca S, Hansell W, Novoa C. 1970. Embryonic mortality in the alpaca. *Biol Reprod*. 3: 243–251.
- Fletcher TF, Weber AF. 2007. Veterinary developmental anatomy. *J Vet Embryol*. 610: 39.
- Goodyer C, Grigorakis S, Patel Y, Kumar U. 2004. Developmental changes in the expression of somatostatin receptors (1–5) in the brain, hypothalamus, pituitary and spinal cord of the human fetus. *Neuroscience*. 125(2): 441–448.
- Graic JM, Peruffo A, Ballarin C, Cozzi B. 2017. The Brain of the Giraffe (*Giraffa Camelopardalis*): Surface Configuration, Encephalization Quotient, and Analysis of the Existing Literature *Anat Rec (Hoboken)*. 300: 1502-11.
- Kim HG, Gu YN, Lee KP, Lee JG, Kim CW, Lee JW, Jeong TH, Jeong YW, Jeon CJ. 2016. Immunocytochemical localization of the calcium-binding proteins calbindin D28K, calretinin, and parvalbumin in bat visual cortex. *Histol Histopathol*. 31(3): 317–27.
- Koutcherov Y, Mai JK, Ashwell KWS, Paxinos G. 2002. Organization of human hypothalamus in fetal development. *The Journal of Comparative Neurology*. 446(4): 301–324.

- Koutcherov Y, Mai JK, Paxinos G. 2003. Hypothalamus of the human fetus. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 26(4): 253–270.
- Landeo L, Mendoza J, Manrique L, Taípe E, Molina R, Contreras J, Ruiz J. First Llama born by in vitro fertilization. 2016. *Reproduction, Fertility and Development* 29(1) 188-188. Abstract.
- Minami S, Kamegai J, Sugihara H, Suzuki N, Wakabayashi I. 1998. Growth hormone inhibits its own secretion by acting on the hypothalamus through its receptors on neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus and somatostatin neurons in the periventricular nucleus. *Endocrine Journal*, 45(Suppl): S19–S26.
- Montelli S, Graič JM, Ruiz JA, Stelletta C, Peruffo A. 2019b. Neurochemical characterization of the hypothalamus of the early fetal and newborn alpaca *Vicugna pacos*. *Anat Rec (Hoboken)*.
- Montelli S, Peruffo A, Zambenedetti P, Rossipal E, Giacomello M, Zatta P, Cozzi B. 2012. Expression of aromatase P450AROM in the human fetal and early postnatal cerebral cortex. *Brain Res.* 1475(0): 11–18.
- Montelli S, Stelletta C, Ruiz JA, Ballarin C, Cozzi B, Peruffo A. 2019a. Mapping of the Early Intrauterine Morphogenesis in the Alpaca (*Vicugna pacos*): External Features and Development of the Cephalic Vesicle in Comparison with the Progressive Carnegie Scale. *Anat Rec (Hoboken)*. 302(7):1226-1237.
- Mermelstein PG, Micevych PE. 2008. Nervous System Physiology Regulated by Membrane Estrogen Receptors. *Rev Neurosci.* 19: 413–424.
- Mouser P, Lévy M, Sojka JE, Ramos-Vara JA. 2009. Cerebellar abiotrophy in an alpaca (*Lama pacos*). *Vet Pathol.* 46(6): 1133-7.
- Münkle M, Waldvogel H., Faull RL. 2000. The distribution of calbindin, calretinin and parvalbumin immunoreactivity in the human thalamus. *J Chem Neuroanat.* 19(3):155–173.
- Peruffo A, Cozzi B, Ballarin C. 2008a. Ontogenesis of brain aromatase P450 expression in the bovine hypothalamus. *Brain Res. Bull.* 75: 60-65
- Peruffo A, Buson G, Cozzi B, Ballarin C. 2008b. Primary cell cultures from fetal bovine hypothalamus and cerebral cortex: A reliable model to study P450Arom and α and β estrogen receptors in vitro. *Neuroscience Letters*, 434(1): 83–87.

- Pfaff DW, Vasudevan N, Kia HK, Zhu YS, Chan J, Garey J, Morgan M, Ogawa S. 2000. Estrogens, brain and behavior: studies in fundamental neurobiology and observations related to women's health. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74: 365–73
- Roselli CE, Stormshak F. 2012. Ontogeny of Cytochrome P450 Aromatase mRNA Expression in the Developing Sheep Brain. *J Neuroendocrinol.* 24(3): 443–452.
- Roselli CE, Resko JA. 1986. Effects of Gonadectomy and Androgen Treatment on Aromatase Activity in the Fetal Monkey Brain1. *Biol Reprod.* 35(1): 106–112.
- Ruiz J, Santayana P, Mendoza J, Landeo L, Huamán E, Ticllacuri F, Mujica F, Silva M, Ratto MH. 2017. Effect of oocyte maturation time, sperm selection method and oxygen tension on *in vitro* embryo development in alpacas. *Theriogenology.* Vol. 95, Pages 127-132.
- Schaub CE, Gersting JA, Keller-Wood M, Wood CE. 2008. Development of ER-alpha and ER-beta expression in the developing ovine brain and pituitary. *Gene Expr. Patterns.* 8: 457–463
- Trasorras V, Giuliano S, Miragaya M. 2013. In vitro production of embryos in South American camelids. *Anim Reprod Sci.* 136(3): 187-93.
- Ulfing N. 2002. Calcium-Binding Proteins in the Human Developing Brain. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology).
- Yamada S, Noguchi D, Ito H, Yamanouchi K. 2009. Sex and regional differences in decrease of estrogen receptor alpha-immunoreactive cells by estrogen in rat hypothalamus and midbrain. *Neurosci. Lett.* 463: 135–139
- Yu SH, Lee JY, Jeon CJ. 2011. Immunocytochemical Localization of Calcium-Binding Proteins, Calbindin D28K-, Calretinin-, and Parvalbumin-Containing Neurons in the Dog Visual Cortex. *Zoolog Sci.* 28(9):694–702.

CAPÍTULO III

ANÁLISIS DE SEMEN DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS ASISTIDO POR COMPUTADORA

Hernán Cucho

RESUMEN

En el presente capítulo se describen algunas particularidades de los sistemas de análisis computarizado de semen (CASA), luego se muestra resultados de evaluaciones seminales en alpacas, llamas y vicuñas empleando el Integrated Semen Analysis System (ISAS®), equipo con que contamos en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas en el Centro Experimental La Raya de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), y que empleamos en el estudio de la fisiología del espermatozoide de las especies antes mencionadas. Se presenta información objetiva para la movilidad espermática y su cinética, concentración, morfología y morfometría, espermatozoides vivos, integridad acrosomal, funcionalidad de la membrana espermática y fragmentación del ADN espermático, en la mayoría de casos en función de diferentes técnicas de recolección de semen como vagina artificial, electroeyaculación, pos cópula y desviación de los conductos deferentes, y durante el proceso de criopreservación de semen.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de los primeros sistemas computarizados de análisis de semen fue por 1974 (Amann, 1979), el primer reporte empleando estos sistemas ocurrió en 1985 (Katz *et al.*, 1985). Es a partir de los años 2000, que los sistemas CASA se posicionan como instrumentos para el análisis seminal, primero en humanos (Mortimer, 2000), y posteriormente en animales.

En la mayoría de especies, existe variabilidad intra e interindividual en los análisis seminales, los que se incrementan al realizar una evaluación subjetiva en éstos. El uso de sistemas objetivos (CASA) nos permite mejorar la confiabilidad de los datos reproductivos (Valverde y Madrigal-Valverde, 2018). Por esta razón, desde el año 2010, en el Centro Experimental La Raya (4130 metros de altitud), de la UNSAAC, venimos realizando trabajos de investigación orientados a conocer la fisiología del espermatozoide de la alpaca, llama y vicuña, de tal suerte que efectuamos estudios para determinar la movilidad, parámetros de movilidad, subpoblaciones espermáticas; morfometría del espermatozoide, índice de fragmentación del ADN espermático, entre otros.

En esta revisión se muestran los resultados de las investigaciones que llevamos a cabo en camélidos sudamericanos, empleando un sistema computarizado de análisis de semen, el Integrated Semen Analysis System (ISAS®), en la Escuela Profesional de Zootecnia de la UNSAAC.

Características de los sistemas CASA

La característica de un sistema de análisis de semen, es que éste comprende aspectos de soporte (hardware) y la programación asociada (software), éstos sirven para diferenciar los diversos sistemas CASA (Valverde y Madrigal-Valverde, 2018).

Para la captura de imágenes, se necesita una cámara de video, en ésta es importante la resolución y la velocidad de captura de imágenes por segundo. En relación a la microscopía en la mayor parte de especies ganaderas (vacuno, alpaca, entre otros) requieren una iluminación de contraste de fase negativa (Valverde y Madrigal-Valverde, 2018). En su mayoría los sistemas CASA, poseen módulos para el análisis de la movilidad espermática, concentración, vitalidad y morfología, y en algunos casos de fragmentación del ADN.

Evaluación de semen de camélidos sudamericanos con sistemas CASA

El equipo ISAS® (Proiser R + D, Paterna, España), del Centro Experimental La Raya, consta de un microscopio de contraste de fases y fluorescencia (Proiser-UOP – UB200i), conectada a una computadora; el sistema cuenta con cinco módulos: movilidad, concentración, vitalidad, morfometría y fragmentación del ADN espermático.

• Movilidad

Los archivos de video se graban y analizan a 25 cuadros por segundo (fps), durante un segundo, para lo cual se emplea 5 μ L de muestra, en el sistema se configura el tamaño de partículas a analizar, la cual depende la procedencia de la muestra seminal, que puede provenir de electroeyaculación, del epidídimo, vagina artificial, de los conductos deferentes o post cópula. El análisis se realiza empleando el objetivo de 10x de contraste de fase negativo, y de preferencia usando cámaras de una determinada altura como las ISAS® D4C20 de 20 μ m de alto, que permite no se superpongan los espermatozoides, y se tenga un análisis más exacto de esta variable, ya que tanto la altura de la cámara, como la velocidad en que son tomadas los fotogramas influyen en los resultados (Bompart *et al.*, 2018)

El análisis de movilidad, nos permitirá conocer el porcentaje de los espermatozoides móviles, así como también la cinética espermática. En el cuadro 1 se muestra información de la movilidad de los espermatozoides de alpacas y llamas colectados por diferentes métodos y evaluados en diferentes momentos del proceso de criopreservación, realizados en La Raya.

Cuadro 1. Promedio y desviación estándar (DS) de la movilidad espermática de alpaca y llama recuperado de la desviación de los conductos deferentes (DCD), vagina artificial (VA), post cópula (PC) y electroeyaculación (EE) en semen fresco, refrigerado y descongelado

Especie	Método colección	Estado semen	Promedio \pm DS (%)	Fuente
Alpaca	DCD	Fresco	30.34 \pm 15.65	Ccalta, 2017
	VA	Fresco	17.70 \pm 6.62	Quispe, 2018
	PC	Fresco	33.47 \pm 20.34	Quispe, 2018
	EE	Fresco	34.88 \pm 23.76	Ciprian, 2019
	DCD	Refrigerado	20.02 \pm 7.80	Ccalta, 2017
	VA	Refrigerado	34.37 \pm 10.85	Quispe, 2018
	EE	Refrigerado	16.36 \pm 8.56	Ciprian, 2019
	DCD	Descongelado	7.63 \pm 2.61	Ccalta, 2017
	VA	Descongelado	4.94 \pm 2.27	Quispe, 2018
	EE	Descongelado	7.23 \pm 4.31	Ciprian, 2019
Llama	EE	Fresco	44.68 \pm 18.93	Ccoiso, 2019
	VA	Fresco	41.58 \pm 18.40	Ccoiso, 2019

Con un sistema de análisis computarizado de semen, también se puede determinar los parámetros de movilidad de los espermatozoides. La velocidad curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$), es la velocidad de la cabeza del espermatozoide a lo largo de la trayectoria curvilínea. La velocidad rectilínea (VSL; $\mu\text{m/s}$), viene a ser la velocidad a lo largo de la trayectoria entre el punto inicial y final de la trayectoria del espermatozoide. La velocidad promedio (VAP; $\mu\text{m/s}$), es la velocidad de la cabeza de un espermatozoide a lo largo de su trayectoria media (Amann y Waberski, 2014; Valverde y Madrigal-Valverde, 2018). Los índices de rectitud (STR = VSL/VAP; %), linealidad (LIN = VSL/VCL; %) y oscilación (WOB = VAP/VCL; %), sirven para caracterizar la calidad del movimiento espermático (Mortimer, 2000; Meza *et al.*, 2018). La desviación de la trayectoria curvilínea respecto de la media, se denomina amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH; μm); el número de las intersecciones de la trayectoria curvilínea y la trayectoria promedio se denomina, frecuencia de batido de la cola (BCF, Hz), (Amann y Waberski, 2014), algunos se muestran en la Figura 1.

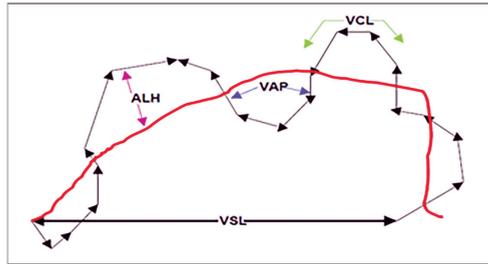


Figura 1. Ilustración de algunos de los parámetros de movilidad evaluados por los sistemas CASA (Quintero-Moreno, 2003).

Los parámetros de movilidad de espermatozoides para alpacas (cuadro 2) en semen fresco colectados por diferentes métodos se detallan a continuación, y en el cuadro 3, se muestra información similar en llamas en semen fresco y tratado con una enzima (papaina) para aumentar las velocidades de sus espermatozoides.

Cuadro 2. Promedio y desviación estándar (DS) de los parámetros de movilidad del espermatozoide de alpaca recuperado de la desviación de los conductos deferentes (DCD), vagina artificial, post cópula y electroeyaculación en semen fresco

Parámetro movilidad	DCD Promedio \pm DS (Meza <i>et al.</i> , 2018)	Vagina artificial Promedio \pm DS (Quispe, 2018)	Poscópula Promedio \pm DS (Quispe, 2018)	Electroeyaculación Promedio \pm DS (Quispe, 2015)
VCL ($\mu\text{m/s}$)	61.4 \pm 31.9	36.09 \pm 5.53	34.62 \pm 8.14	47.38 \pm 25.53
VSL ($\mu\text{m/s}$)	15.8 \pm 11.2	10.03 \pm 2.55	9.56 \pm 1.55	6.79 \pm 2.76
VAP ($\mu\text{m/s}$)	31.0 \pm 17.3	16.50 \pm 5.84	18.80 \pm 3.81	18.81 \pm 8.33
LIN (%)	27.7 \pm 16.4	27.88 \pm 5.81	28.18 \pm 3.30	22.44 \pm 18.95
STR (%)	51.1 \pm 22.0	49.73 \pm 17.67	51.50 \pm 4.59	42.09 \pm 17.74
WOB (%)	52.4 \pm 14.5	46.18 \pm 15.19	54.76 \pm 5.23	47.51 \pm 16.98
ALH (μm)	3.21 \pm 1.4	1.65 \pm 0.38	1.57 \pm 0.48	0.13 \pm 0.21
BCF (Hz)	4.39 \pm 2.8	3.33 \pm 1.96	1.36 \pm 0.49	0.28 \pm 0.50

Cuadro 3. Promedio y desviación estándar (DS) de los parámetros de movilidad del espermatozoide de llama colectado por electroeyaculación (EE) en semen fresco (Ccoiso, 2019) y degelificado 60 minutos en papaína (Cucho *et al.*, 2018).

Parámetro	EE (fresco) Promedio ± DS	EE (degelificado papaína) Promedio ± DS
VCL (µm/s)	60.82 ± 11.47	84.97 ± 10.90
VSL (µm/s)	13.10 ± 2.12	22.60 ± 2.56
VAP (µm/s)	28.75 ± 3.88	38.69 ± 3.79
LIN (%)	22.12 ± 4.75	26.39 ± 4.90
STR (%)	45.63 ± 4.57	57.10 ± 6.32
WOB (%)	48.01 ± 5.78	45.93 ± 4.98
ALH (µm)	3.18 ± 0.71	4.06 ± 1.21
BCF (Hz)	3.68 ± 1.20	6.41 ± 2.27

Los espermatozoides no tienen las mismas velocidades, como se ha comprobado en estudios en toros, caprinos, ovinos, y otras especies (Muiño *et al.*, 2008; Dorado *et al.*, 2010; Bravo *et al.*, 2011), se reporta la existencia de subpoblaciones espermáticas de acuerdo a la cinética, estudios que se realizaron en alpacas (cuadro 4) y llamas (cuadro 5), estas evaluaciones implican el uso de estadística multivariada (Valverde y Madrigal-Valverde, 2018)

Cuadro 4. Subpoblaciones de espermatozoides de alpaca recuperados de la desviación de los conductos deferentes (Meza, 2014)

Parámetros de movilidad	Subpoblaciones de espermatozoides (SP)		
	SP1	SP2	SP3
N° espermatozoides	126011	69704	18491
Porcentaje (%)	58.83	32.54	8.63
VCL (µm/s)	40.19 ± 13.49	81.84 ± 13.92	129.23 ± 19.85
VSL (µm/s)	10.74 ± 6.40	9.60 ± 10.23	33.13 ± 17.14
VAP (µm/s)	20.81 ± 7.39	40.23 ± 9.73	66.35 ± 19.90
ALH (µm)	3.25 ± 1.41	3.25 ± 1.41	3.22 ± 1.39
BCF (Hz)	4.73 ± 2.61	4.72 ± 2.62	4.75 ± 2.64

Cuadro 5. Subpoblaciones de espermatozoides de llama colectados por vagina artificial y electroeyaculación (Ccoiso, 2019)

Parámetros de movilidad	Subpoblaciones de espermatozoides (SP)			
	SP1	SP2	SP3	SP4
N° espermatozoides	4175	919	14914	10884
Porcentaje (%)	13.51	2.97	48.28	35.23
VCL ($\mu\text{m/s}$)	104.77 \pm 13.47	152.80 \pm 22.48	36.66 \pm 10.76	68.27 \pm 10.49
VSL ($\mu\text{m/s}$)	20.94 \pm 12.82	31.95 \pm 19.05	10.51 \pm 6.04	15.20 \pm 9.51
VAP ($\mu\text{m/s}$)	47.14 \pm 12.08	65.70 \pm 18.30	19.85 \pm 6.43	33.25 \pm 9.05
ALH (μm)	5.38 \pm 0.95	7.20 \pm 1.28	2.26 \pm 0.59	3.73 \pm 0.72
BCF (Hz)	4.89 \pm 2.43	4.92 \pm 2.60	3.48 \pm 2.12	4.67 \pm 2.28

• Concentración

La concentración de espermatozoides (millones de espermatozoides por mL), se evalúa con un Spermtrack® (Proiser R+D, S.L., Paterna España), empleando 3 μL de semen, y evaluado a 100 aumentos, en el cuadro 6, se muestran valores obtenidos de trabajos efectuados en La Raya.

Cuadro 6. Promedio y desviación estándar (DS) de la concentración espermática de alpaca y llama recuperado de la desviación de los conductos deferentes (DCD), vagina artificial (VA), post cópula (PC) y electroeyaculación (EE) en semen fresco

Especie	Método colección	Promedio \pm DS (10 ⁶ /mL)	Fuente
Alpaca	DCD	151.03 \pm 70.60	Quispe, 2015
	VA	94.78 \pm 60.20	Quispe, 2018
	EE	67.92 \pm 67.18	Huanca, 2015
	EE	42.34 \pm 15.25	Ciprian, 2019
	PC	100.32 \pm 56.13	Huanca, 2015
Llama	EE	80.39 \pm 71.93	Rodríguez, 2013
	EE	101.71 \pm 39.52	Ccoiso, 2019
	VA	146.20 \pm 64.83	Ccoiso, 2019

• Morfología y morfometría

Los análisis de la morfología del espermatozoide, es una prueba de control, que muestra el estado funcional de los testículos, epidídimo y glándulas sexuales

de los reproductores (Valverde y Madrigal-Valverde, 2018). La evaluación de la morfometría de un espermatozoide, nos permite detectar alteraciones en la espermiogénesis y en la maduración epididimaria (Hidalgo *et al.*, 2006), lo que permitiría una eficiente selección de reproductores.

Para evaluar un espermatozoide es necesario fijarlo y teñirlo, para distinguir sus diferentes componentes, cabeza, pieza intermedia, cola, acrosoma (Valverde y Madrigal-Valverde, 2018), para ello se puede usar hematoxilina de Harris, Diff Quik[®], Hemacolor[®], éstas tinciones tienen influencia en la identificación de las diferentes áreas de las células espermáticas (Maroto-Morales *et al.*, 2016) y se emplearon para evaluar dichas células de alpacas, llamas y vicuñas (Ordoñez *et al.*, 2012; López, 2014; Cucho *et al.*, 2019; Gallegos, 2019; Puelles, 2019). La muestra ya teñida es analizada en el módulo de morfometría del ISAS[®], empleando el objetivo de 100x de campo claro y la cámara digital de video. En los espermatozoides de camélidos se emplea un tamaño de las cuadrículas de captura de video de 768x576x8 bits con 256 niveles de grises. La resolución de las imágenes se configura a 0.08 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ en ambos ejes.

El módulo de morfometría del sistema ISAS[®], nos determina características de tamaño de la cabeza (longitud, anchura, perímetro y área), de forma (elipticidad, elongación, regularidad y rugosidad), también nos dan información de la proporción de acrosoma en relación a la cabeza; además proporciona data de la pieza intermedia (área y anchura), distancia de inserción de la pieza intermedia en la cabeza y el ángulo en que está insertados (Soler *et al.*, 2005) (Figura 2).

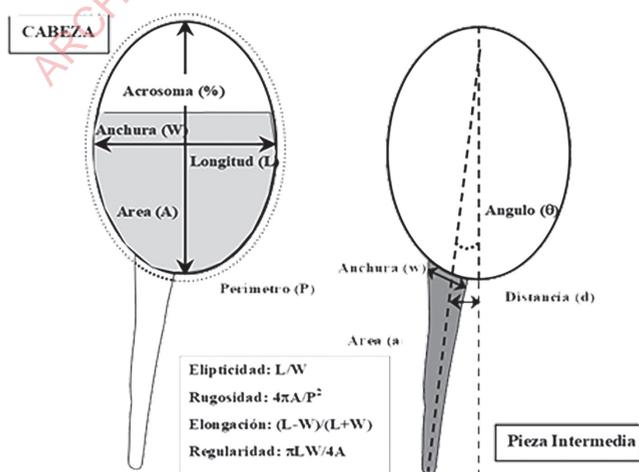


Figura 2. Parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide (Soler *et al.*, 2005)

En la figura 2, se muestran los parámetros de tamaño de la cabeza del espermatozoide: anchura (W ; μm), longitud (L ; μm), perímetro (P ; μm), área (A , μm^2), el porcentaje de acrosoma, los parámetros de forma: elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad, que son adimensionales. Los parámetros de la pieza intermedia del espermatozoide: distancia (d ; μm), anchura (w ; μm), área (a ; μm^2) y ángulo de inserción (θ ; $^\circ$). La figura 3, muestra las imágenes teñidas y luego digitalizadas de los espermatozoides de alpaca por el sistema ISAS®.

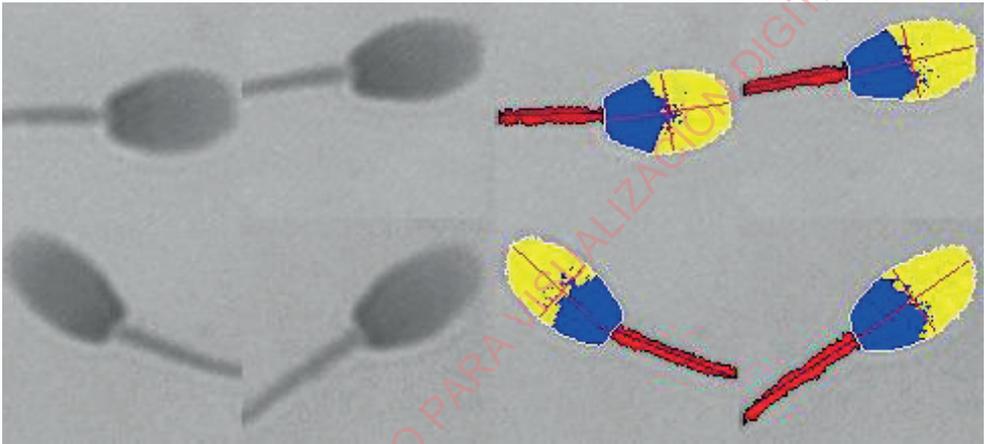


Figura 3. Espermatozoides de alpaca teñidos con Hemacolor®. Izquierda imágenes capturadas en el microscopio, derecha imágenes digitalizadas con un sistema ISAS®.

Los parámetros morfométricos se han determinado, en muestras provenientes de vagina artificial, electroeyaculación, poscópula y de espermatozoides recuperados de los conductos deferentes, en el cuadro 7, se presentan los valores obtenidos de semen colectado por electroeyaculación en alpacas, llamas y vicuñas y teñidos con Hemacolor®.

Cuadro 7. Promedio y desviación estándar (DS) de los parámetros morfométricos de los espermatozoides de alpaca (Ciprian, 2019), llama (Gallegos, 2019) y vicuña (Puelles, 2019), teñidos con Hemacolor® en semen fresco.

Región	Parámetro morfométrico	Alpaca (n=2060) Promedio ± DS	Llama (n=8866) Promedio± DS	Vicuña (n=1454) Promedio ± DS
Tamaño de la cabeza	Longitud (µm)	5.80 ± 0.51	5.21 ± 0.41	4.75 ± 0.47
	Anchura (µm)	3.16 ± 0.31	3.17 ± 0.27	3.04 ± 0.31
	Área (µm ²)	15.03 ± 2.03	13.70 ± 1.67	11.89 ± 1.75
	Perímetro (µm)	17.04 ± 1.75	16.75 ± 1.51	14.96 ± 1.62
Forma de la cabeza	Elipticidad	1.85 ± 0.22	1.65 ± 0.16	1.57 ± 0.17
	Rugosidad	0.66 ± 0.08	0.62 ± 0.07	0.68 ± 0.09
	Elongación	0.30 ± 0.05	0.24 ± 0.05	0.22 ± 0.05
	Regularidad	0.96 ± 0.05	0.95 ± 0.05	0.96 ± 0.05
Pieza inter-media	Anchura (µm)	1.37 ± 0.44	1.39 ± 0.37	1.34 ± 0.47
	Área (µm ²)	3.71 ± 0.94	2.94 ± 0.82	2.86 ± 0.81
	Dist. inserción (µm)	0.22 ± 0.16	0.23 ± 0.17	0.27 ± 0.20
	Ang. Inserción (°)	15.28 ± 14.16	9.50 ± 10.99	1.49 ± 0.49

En los últimos años se ha desarrollado una técnica para poder observar la morfología de las células espermáticas sin la necesidad de teñirlas, empleando el Trumorph® (Soler *et al.*, 2015, 2016). Para ello se utiliza una muestra de 5 µL de semen, colocada en un portaobjetos, el cual es introducido en el Trumorph®, donde es sometida a una presión de 6 kPa y 60°C por 6 segundos, luego la muestra es evaluada usando una iluminación de contraste de fase negativo a 400 aumentos, con dicha técnica se ha realizado trabajos exploratorios en alpacas (Ordoñez *et al.*, 2016), llamas (Cucho *et al.*, 2016) y vicuñas (Puelles, 2019)



Figura 4. Espermatozoides de llama analizados con el Trumorph®. A: normal, B: piriforme, C: alargado, D: delgado, E: redondeados (Cucho *et al.*, 2016)

- **Espermatozoides vivos**

La determinación de esta variable, se puede realizar usando una tinción de eosina-nigrosina, colorante de Hancock o utilizando fluorescencia (Tinción Duo-Vital® o VitalTest® - Fig. 5), en todos los casos las muestras se analizan en el módulo de vitalidad del ISAS®, empleando un objetivo de 40x.

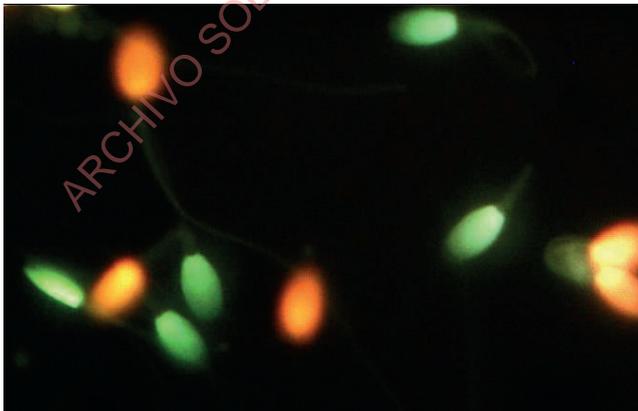


Figura 5. Análisis de vitalidad en espermatozoides de alpaca usando fluorescencia (Duo Vital®), y aplicando el sistema ISAS®; verdes: vivos, rojos: muertos (Quispe, 2016).

En el cuadro 8 se observa el porcentaje de espermatozoides vivos de alpacas y llamas colectados por diferentes métodos y evaluados en diferentes momentos del proceso de criopreservación.

Cuadro 8. Promedio y desviación estándar (DS) del porcentaje de espermatozoides vivos de alpaca y llama recuperados de la desviación de los conductos deferentes (DCD), vagina artificial (VA), post cópula (PC) y electroeyaculación (EE) en semen fresco, refrigerado y descongelado

Especie	Tinción	Método colecta	Estado semen	Promedio \pm DS (%)	Fuente
Alpaca	Vital test®	DCD	Fresco	50.72 \pm 1.78	Ccalta, 2017
	Duo vital®	EE	Fresco	63.89 \pm 15.01	Huanca, 2015
	Duo vital®	PC	Fresco	70.16 \pm 14.33	Huanca, 2015
	Eosina – nigrosina	VA	Fresco	60.78 \pm 11.19	Quispe, 2018
	Eosina – nigrosina	EE	Refrigerado	57.82 \pm 5.78	Ciprian, 2019
	Vital test®	DCD	Refrigerado	30.07 \pm 9.63	Ccalta, 2017
	Eosina – nigrosina	VA	Refrigerado	61.58 \pm 11.65	Quispe, 2018
	Vital test®	DCD	Descongelado	13.65 \pm 2.54	Ccalta, 2017
	Eosina – nigrosina	VA	Descongelado	44.97 \pm 9.43	Quispe, 2018
	Eosina – nigrosina	EE	Descongelado	45.30 \pm 9.47	Ciprian, 2019
Llama	Eosina - nigrosina	EE	Fresco	64.56 \pm 13.54	Ccoiso, 2019
	Eosina – nigrosina	VA	Fresco	70.23 \pm 13.57	Ccoiso, 2019

DCD: desviación de conductos deferentes; EE: electroeyaculación; PC: poscópula; VA: vagina artificial

• Integridad acrosomal

El estudio de esta variable es importante, ya que permite evaluar los efectos de diferentes biotecnologías reproductivas (Giuliano *et al.*, 2012), para su estudio empleamos la tinción de Coomassie Blue, según lo descrito por Fumuso *et al.*, (2014), las observaciones también se realizan a 400 aumentos en el módulo de vitalidad del ISAS®. Los espermatozoides con presencia de capuchón acrosomal (teñidos de azul), o con ausencia de capuchón acrosomal (sin teñir) se muestran en la figura 6, e información sobre esta variable evaluada en La Raya se halla en el cuadro 9.

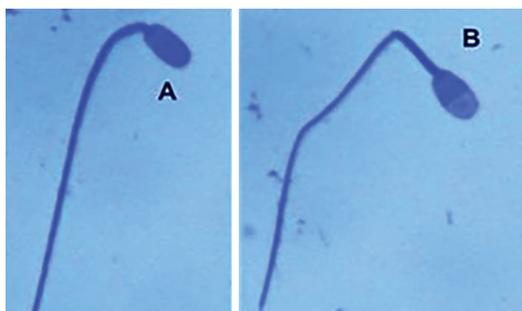


Figura 6. Espermatozoides de llama teñidos con la tinción de Coomassie blue. A: espermatozoides con acrosoma. B: espermatozoides sin acrosoma (Ccoiso, 2019)

Cuadro 9. Promedio y desviación estándar (DS) del porcentaje de integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca y llama recuperados de la desviación de los conductos deferentes (DCD), vagina artificial (VA), post cópula (PC) y electroeyaculación (EE) en semen fresco, refrigerado y descongelado

Especie	Método colección	Estado semen	Promedio \pm DS (%)	Fuente
Alpaca	DCD	Fresco	68.15 \pm 4.81	Ccalta, 2017
	VA	Fresco	76.46 \pm 16.23	Quispe, 2018
	PC	Fresco	73.84 \pm 8.19	Quispe, 2018
	VA	Refrigerado	65.45 \pm 13.62	Quispe, 2018
	DCD	Refrigerado	33.62 \pm 6.01	Ccalta, 2017
	VA	Descongelado	53.79 \pm 8.94	Quispe, 2018
	DCD	Descongelado	30.76 \pm 7.83	Ccalta, 2017
Llama	EE	Fresco	59.33 \pm 7.16	Ccoiso, 2019
	VA	Fresco	67.35 \pm 11.00	Ccoiso, 2019

DCD: desviación de conductos deferentes; EE: electroeyaculación; PC: poscópula; VA: vagina artificial

• Funcionalidad de la membrana espermática

Esta variable es evaluada con el hypoosmotic swelling test (HOS) (Jeyendran *et al.*, 1984), es un método fácil, rápido y efectivo. La prueba de inflamación hipoosmótica supone que solo las células con membranas intactas (células vivas) se hincharán en soluciones hipotónicas, también sirve como un indicador útil de su potencial de fertilidad.

Las evaluaciones se realizan con una solución hipoosmótica de 50 mOsm/kg, en una proporción de 4:1 en relación a la muestra de semen, luego ésta se incuba 5 minutos, la reacción es detenida con una solución formolada (Giuliano *et al.*, 2002). La reacción de endósmosis se evalúa a 40x. Los espermatozoides con la cola enrollada o semi enrollada, se consideran que tienen funcionalidad de la membrana espermática (Fig.7); en el cuadro 10, se consigna información de esta variable.



Figura 7. Espermatozoides de alpaca sometidos a una solución hipoosmótica de 50 mOsm/kg. A: sin reacción. B: con funcionalidad de la membrana espermática (Quispe, 2016)

Cuadro 10. Promedio y desviación estándar (DS) del porcentaje de espermatozoides con funcionalidad de la membrana espermática de alpaca y llama recuperados de la desviación de los conductos deferentes (DCD), vagina artificial (VA), post cópula (PC) y electroeyaculación (EE) en semen fresco, refrigerado y descongelado

Especie	Método colección	Estado semen	Promedio \pm DS (%)	Fuente
Alpaca	DCD	Fresco	54.89 \pm 4.92	Ccalta, 2017
	VA	Fresco	53.13 \pm 10.90	Quispe, 2018
	PC	Fresco	68.75 \pm 5.21	Quispe, 2018
	EE	Fresco	45.92 \pm 8.91	Ciprian, 2019
	DCD	Refrigerado	30.82 \pm 5.41	Ccalta, 2017
	VA	Descongelado	41.31 \pm 5.74	Quispe, 2018
	DCD	Descongelado	12.41 \pm 2.42	Ccalta, 2017
	EE	Descongelado	23.45 \pm 6.91	Ciprian, 2019
Llama	EE	Fresco	57.33 \pm 8.91	Ccoiso, 2019
	VA	Fresco	54.30 \pm 9.29	Ccoiso, 2019

DCD: desviación de conductos deferentes; EE: electroeyaculación; PC: post cópula; VA: vagina artificial

- **Fragmentación del ADN espermático**

La integridad del ADN espermático, es un factor importante en la fertilidad del macho, pues es determinante para el éxito en la fecundación, desarrollo normal del embrión y posterior feto (Sakkas y Alvarez 2010; Gonsálvez *et al.*, 2008).

La evaluación de la fragmentación del ADN espermático, es realizada con el test de la dispersión de la cromatina espermática - SCD (Fernández *et al.*, 2003), empleando el kit Halomax®, los detalles técnicos del proceso se han descrito en diferentes publicaciones, tanto para el caso de humanos, como para el de animales (Fernández *et al.*, 2005; Enciso *et al.*, 2006; Cortes – Gutiérrez *et al.*, 2008; Gonsálvez *et al.*, 2008). Los espermatozoides que contienen ADN fragmentado presentan un gran halo de difusión de los fragmentos de cromatina, mientras que aquellos que no están afectados por roturas en su ADN, no presentan halo o éste es muy reducido y compacto (Fig. 8); en el cuadro 11, se muestra información del trabajo realizado por Huanca (2015) en alpacas.

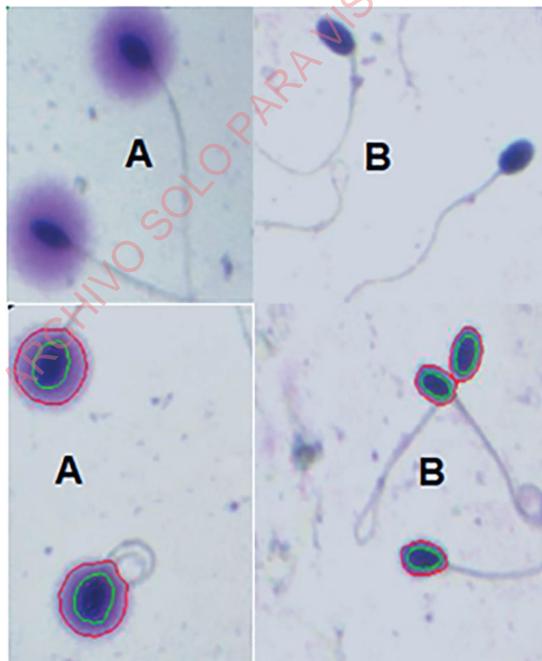


Figura 8. Espermatozoides de alpaca sometidos al test de dispersión de la cromatina (Halomax®), evaluados en el ISAS®. A: espermatozoides con ADN fragmentado. B: espermatozoides con el ADN intacto. Los espermis inferiores muestran demarcadas las áreas del núcleo (verde) y halo (rojo)

Cuadro 11. Índice de fragmentación de ADN espermático en alpacas
(Huanca, 2015)

Método de colecta	Espermatozoides Fragmentados Prom. \pm DS (%)	Espermatozoides no Fragmentados Prom. \pm DS (%)	Criterio de evaluación
Electroeyaculación	13.65 \pm 18.98	86.35 \pm 18.98	Bueno
Poscópula	8.42 \pm 10.28	91.57 \pm 10.28	Bueno
Desviación de conductos deferentes	36.44 \pm 22.50	63.56 \pm 22.50	Critico

CONCLUSIONES

Desde el año 2011, se viene investigando sobre la fisiología de los espermatozoides de alpacas, llamas y vicuñas, a través de tesis de pregrado de estudiantes de la Escuela Profesional de Zootecnia de la UNSAAC, generando información objetiva de la movilidad, parámetros de movilidad y subpoblaciones espermáticas; morfometría y fragmentación del ADN espermático de éstas especies.

AGRADECIMIENTOS

A la "Cooperación Interinstitucional con las Universidades Francófonas de Bélgica y la UNSAAC (2009 al 2013), y a los proyectos de investigación "Validación y Aplicación de Biotecnologías Reproductivas en el proceso de Mejoramiento y Valoración Genética en Alpacas en las provincias de Canas, Canchis y Quispicanchis en la Región Cusco" de la UNSAAC" y "Fisiología del espermatozoide de llama y su aplicación en la inseminación artificial con semen criopreservado", ambas financiadas con el fondo canon de la UNSAAC, los que han financiado los trabajos de investigación realizados en el Centro Experimental La Raya, y a los colegas Enrique Ampuero, César Ordóñez, Aydee Meza, Nancy Huanca, Hurley Quispe, Rene Ciprian, Ruth Ccalta, Yolvi López. Noemí Calderón, Rufina Ccoiso, Mitzi Gallegos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amann RP. 1979. Computerized measurement of sperm velocity and percentage of motile sperm. In: Fawcett DW, Bedford GM, editors. The spermatozoon. Baltimore, MD: Urban & Schwarzenberg. 431 – 435.
- Amann RP, Waberski D. 2014. Computer – assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potencial developments. *Theriogenology*. 81: 5 – 17.
- Bompart D, García-Molina A, Valverde A, Caldeira C, Yániz J, Núñez de Murga M, Soler C. 2018. CASA-Mot technology: how results are affected by the frame rate and counting chamber. *Reprod Fertil Dev*. 30: 810 - 819.
- Bravo JA, Montanero J, Calero R, Roy TJ. 2011. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. *Anim Reprod Sci*. 129: 22 – 29.
- Ccalta R. 2017. Efecto de la adición de colesterol en la criopreservación de semen de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco. Perú.
- Ccoiso R. 2019. Estimación de parámetros de motilidad y determinación de subpoblaciones espermáticas en semen de llama (*Lama glama*). Tesis Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco. Perú.
- Ciprian R. 2019. Uso de la dimetilformamida en la criopreservación de semen de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco. Perú.
- Cortés - Gutiérrez EI, Crespo F, Gosálvez A, Dávila- Rodríguez MI, López-Fernández C, Gosalvez J. 2008: DNA fragmentation in frozen sperm of *Equus asinus*: Zamorano-Leonés, a breed at risk of extinction. *Theriogenology*. 69: 1022 - 1032.
- Cucho H, Ordoñez C, Ampuero E, Ccalta R, Alarcón V, Huilca E, Huanca N. 2016. Llama sperm morphology (*Lama glama*) in unstained cells using the Trumorph®. *Spermova*. 6: 79.
- Cucho H, Ccalta R, Meza A, Mamani R, Ccalta A, Cabeza U, Ampuero. 2018. Efecto de dos tiempos de incubación en papaína en los parámetros cinéticos de los espermatozoides de llama (*Lama glama*). Memorias VIII Congreso Mundial sobre Camélidos – Tomo I, Oruro, Bolivia. 77 – 78.
- Cucho H, López Y, Caldeira C, Valverde A, Ordóñez C, Soler C. 2019. Comparison of three different staining methods for the morphometric char-

- acterization of Alpaca (*Vicugna pacos*) sperm using ISAS® CASA-Morph system. *Nova Biol. Reperta.* 6: 284 – 291.
- Dorado J, Molina I, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M. 2010. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Florida goats. *Theriogenology.* 74: 795 – 804
- Enciso M, López-Fernández C, Fernández JL, García P, Gosálvez J. 2006. A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright – field or fluorescence microscopy. *Theriogenology.* 65: 308 - 316.
- Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vásquez R. 2003. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl.* 24: 59 - 66
- Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, Lafromboise M, De Jonge C. 2005 Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril.* 84: 833 - 842.
- Fumuso FG, Giménez ML, Neild DM, Giuliano SM, Chaves MG, Carretero MI. 2014. Comparación de dos métodos de lavado y tiempo de conservación de los frotis para evaluar el acrosoma en espermatozoides de llama mediante la tinción de Coomassie Blue. *Spermova.* 4: 50 – 53.
- Gallegos M. 2019. Determinación de las características macroscópicas, microscópicas y subpoblaciones espermáticas del semen de llama (*Lama glama*) colectado por electroeyaculación y vagina artificial. Tesis Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco. Perú.
- Giuliano S, Ferrari M, Spirito S, Campi S, Director A, Fernández H. 2002. Methodological advances on the hypoosmotic swelling test (HOS test) in *Lama glama* spermatozoa. *Bioxcell.* 17 : 149
- Giuliano S, Bisiau C, Carretero MI. 2012. Use of Coomassie blue to evaluate acrosomal status in llama spermatozoa. Preliminary results. *InVet.* 14: 279.
- Gonsálvez J, Nuñez R, Caballero P, Fernández JL, Cortes- Gutiérrez EI, López - Fernández C. 2008. Fragmentación del ADN espermático ¿un concepto dinámico o estático? *Revista Iberoamericana de fertilidad y reproducción. Humana.* 25: 195 - 206
- Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado J, Soler C. 2006. Morphometric classification of Spanish Thoroughbred stallion semen according to sperm head size measurements. *Anim Reprod Sci.* 94: 26 - 28.

- Huanca N. 2015. Índice de fragmentación de ADN espermático en semen de alpacas (*Vicugna pacos*) utilizando el Integrated Semen Analysis System – ISAS. Tesis Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco. Perú.
- Jeyendran R, Van der Van H, Pérez – Pelaez M, Crabo B, Zaneveld L. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod Fert. 70: 219 – 228.
- Katz DF, Davis RO, Delandmeter BA, Overstreet JW. 1985. Real-time analysis of sperm motion using automatic video image digitization. Comp Meth Prog Biomed. 21: 173-182.
- López Y. 2014. Comparación de tres métodos de tinción para determinar la morfometría del espermatozoide de alpaca usando el Integrated Sperm Analysis System (ISAS). Tesis Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco. Perú.
- Mortimer S. 2000. CASA - Practical aspects. J. Androl. 21: 515 - 524
- Maroto-Morales A, García-Álvarez O, Ramón M, Martínez-Pastor F, Fernández-Santos M, Soler AJ, Garde JJ. 2016. Current status and potencial of morphometric sperm analysis. J. Asian Journal of Andrology. 18: 863 - 870.
- Meza A. 2014. Estimación de parámetros de motilidad y determinación de subpoblaciones espermáticas en espermias de alpaca (*Lama pacos*) colectado por desviación del conducto deferente. Tesis Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco. Perú.
- Meza A, Caldeira C, Ordoñez C, Valverde A, Ordoñez C, Ampuero E, Cucho H, Soler C. 2018. Sperm kinematic characterization of alpaca (*Vicugna pacos*) during the reproductive season. Reprod domestic animals. 53: 1415 - 1423.
- Muiño R, Tamargo C, Hidalgo CO, Peña AI. 2008. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: effects of cryopreservation and between – bull variation. Anim Reprod Sci. 109: 27 - 39.
- Ordóñez C, Ampuero E, Cucho H, Franco, E. 2012. Avances en la determinación de la velocidad del espermatozoide de alpaca en semen diluido usando el Integrated Sperm Analysis System (ISAS). Spermova 2: 63 - 64.
- Ordoñez C, Huanca N, Ampuero E, Ccalta R, Alarcón V, Huilca E, Cucho H. 2016. Morphological analysis of alpaca spermatozoa (*Vicugna pacos*) in unstained cells using the Trumorph®. Spermova. 6: 81.

- Puelles O. 2019. Morfología y morfometría del espermatozoide de vicuña (*Vicugna vicugna mensalis*). Tesis Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco. Perú.
- Quintero-Moreno A. 2003. Estudios sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis Doctorado en Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra. España.
- Quispe A. 2015. Funcionalidad de la membrana espermática en semen de alpaca (*Vicugna pacos*) colectado por desviación de conducto deferente. Tesis Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco. Perú.
- Quispe H, Ordoñez C, Ampuero E, Ccalta R, Mendoza M, Sotomayor R, Huanca N, Cucho H. 2016. Osmotic tolerance and acrosomal integrity in sperm alpaca recovered from the vas deferens. *Spermova*. 6: 80.
- Quispe W. 2018. Comparación del efecto de dos curvas de congelación en semen de alpaca (*Vicugna pacos*) colectada por vagina artificial y poscópula. Tesis Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco. Perú.
- Rodríguez M. 2013. Índice de fragmentación del ADN espermático y test de HOS en semen de llamas (*Lama glama*) utilizando el Integrated Sperm Analysis System (ISAS). Tesis Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco. Perú.
- Sakkas D, Alvarez J. 2010. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril*. 93: 1027 - 1036.
- Soler C, Gaßner P, Nieschlag E, de Montserrat JJ, Gutiérrez R, Sancho M, Buendía P, Álvarez JG, Behre HM, Cooper TG. 2005. Utilización del Integrated Semen Analysis System (ISAS®) para el análisis morfométrico espermático humano y su significado en las técnicas de reproducción asistida. *Rev Int Androl*. 3: 112 - 119.
- Soler C, García-Molina A, Contell J, Silvestre MA, Sancho M. 2015. The Tru-morph® system: The universal technique for the observation and analysis of the morphology of living sperm. *Anim Reprod Sci*. 158 : 1 - 10
- Soler C, García-Molina A, Sancho M, Contell J, Núñez M, Cooper TG. 2016. A new technique for analysis of human sperm morphology in unstained cells from raw. *Reprod Fertil Dev*. 28: 428 - 433.
- Valverde A, Madrigal-Valverde M. 2018. Sistemas de análisis computarizado de semen en la reproducción animal. *Agron. Mesoam*. 29: 469 - 484.

CAPÍTULO IV

RELACIÓN DEL PLASMA SEMINAL CON LOS ESPERMATOZOIDES DE SEMEN FRESCO Y CRIOPRESERVADO DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

María Ignacia Carretero, Fernanda Gabriela Fumuso y
María Susana Giuliano

RESUMEN

El plasma seminal (PS) actúa como un medio de transporte para los espermatozoides a través del tracto reproductivo de la hembra y del macho. Además, regula la osmolaridad del eyaculado a través de los componentes inorgánicos, es fuente de energía para los espermatozoides, brinda protección buffer frente a los cambios de pH, protege a los espermatozoides de los efectos deletéreos de las especies reactivas del oxígeno a través de sus agentes antioxidantes y regula la respuesta inmune del tracto reproductivo de la hembra. Por otra parte, las proteínas del PS han sido asociadas a eventos relacionados con la fertilización como la maduración y capacitación espermática y como posible medio de interacción de los espermatozoides con el oviducto y el ovocito. Similar a otras especies, en los camélidos sudamericanos (CSA) se ha estudiado la composición proteica del PS. Es así que, se determinó que el factor de crecimiento nervioso beta (β -NGF) conforma entre el 15 al 45% de las proteínas totales del PS de la alpaca, llama y camello; y que no sólo estaría implicado en el proceso de ovulación, sino que también, podría tener un rol en la fisiología del espermatozoide de llama y del resto de los CSA. Es por esta razón que, se han realizado estudios que evalúan el efecto del PS sobre espermatozoides de semen fresco y epididimarios de estas especies. Por otra parte, la filancia y elevada viscosidad del PS de los CSA, que no disminuyen con la incubación en el tiempo caracterizan los eyaculados de estas especies, diferenciándolos del resto de las especies productivas y dificultando el desarrollo de biotecnologías reproductivas. En este sentido, en muchas especies, el PS es rutinariamente diluido o removido previo al proceso de criopreservación de semen; esto puede tener efectos positivos o negativos sobre la función espermática y la fertilidad. También, el PS ha sido agregado luego del proceso de criopreservación. Ambas situaciones fueron experimentadas en espermatozoides refrigerados y congelados de llama y se presentan en este capítulo. A pesar de un notable avance en el conocimiento

de las funciones del PS, todavía existen controversias acerca de las acciones del PS en la función espermática, en la fertilidad del macho y la relación de éste sobre los espermatozoides criopreservados de CSA.

ARCHIVO SOLO PARA VISUALIZACIÓN DIGITAL

INTRODUCCIÓN

Durante la eyaculación en el tracto reproductivo de la hembra, los espermatozoides son transportados en un fluido biológico, el PS. Se define al PS como una secreción compleja compuesta por iones inorgánicos, azúcares, sales orgánicas, lípidos, enzimas, prostaglandinas, proteínas y varios factores producidos por los testículos, epidídimos y glándulas sexuales accesorias del macho (Maxwell *et al.*, 2007). Inicialmente, se le otorgó al PS un rol de transporte y nutrición; actualmente, debido a su composición, principalmente proteínas y otras moléculas como azúcares y lípidos que se combinan e interaccionan con compuestos de la superficie de los espermatozoides, se ha sugerido que el mismo posee también una función biológica (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011). Por ejemplo, las proteínas del PS han demostrado tener influencia en la maduración espermática (Dacheux y Paquignon, 1980; Dacheux *et al.*, 2005), la estabilización de las membranas (Chang, MC., 1957) y la capacitación espermática (Manjunath y Thérien, 2002), así como, en la interacción con el oviducto (Gwathmey *et al.*, 2006; Zampini *et al.*, 2017) y el ovocito (Töpfer-Petersen *et al.*, 1998). Además, el PS tendría un rol indirecto en la reproducción al activar mecanismos inflamatorios e inmunes en el tracto reproductivo de la hembra (Bromfield J.J., 2014; Schjenken y Robertson, 2014; Rath *et al.*, 2016).

Las proteínas del PS han sido objeto de estudio y se han dividido en tres familias principales: las adhesinas espermáticas (spermadhesins), las proteínas con fibronectina dominios tipos-2 (BSPs: Binder of Sperm Proteins) y las proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISPs: Cysteine Rich Secretory Proteins) (de Graff *et al.*, 2014). La mayor parte de ellas derivan de las glándulas sexuales accesorias (de Graff *et al.*, 2014) y su concentración varía entre especies e incluso entre individuos de una misma especie (Druart *et al.*, 2013). Tanto el carnero como el porcino presentan altas concentraciones de BSPs y adhesinas (de Graff *et al.*, 2014). Mientras que, el PS del toro contiene elevadas cantidades de BSPs, en el equino se detectan altas concentraciones de CRISPs. Por otro lado, la llama, alpaca y camello presentan elevadas concentraciones de un factor de crecimiento nervioso beta (β -NGF), al que se le ha atribuido un rol principalmente ovulatorio (Adams *et al.*, 2005; Druart *et al.*, 2013; de Graff *et al.*, 2014). Pequeñas cantidades de este factor han sido identificadas también en especies de ovulación espontánea como el toro, el carnero y el padrillo equino (de Graff *et al.*, 2014). Queda por

determinar si esta proteína tiene efectos similares en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal en las especies de ovulación espontánea como el establecido en aquellas de ovulación inducida. Otro proteína encontrada en altas concentraciones en el PS de alpacas es la mucina 5B, vinculada a la viscosidad y elevada filancia del semen de esta especie (Kershaw-Young y Maxwell, 2012).

No obstante, los reportes referidos a los efectos del PS en la fisiología espermática son contradictorios, ejerciendo el PS un efecto positivo o negativo en la función de los espermatozoides dependiendo de la especie estudiada. Inclusive, en la misma especie se ha observado variabilidad en el efecto que ejerce el PS sobre la funcionalidad espermática (Maxwell *et al.*, 1999; O' Meara *et al.*, 2007; Leahy *et al.*, 2010). Se ha hipotetizado que esta variabilidad en la función y efecto del PS podría explicarse en parte, por la diferente composición proteica del PS, cuya causa, a su vez, podría deberse a las diferencias en el tamaño y estructuras de las glándulas accesorias, así como en la presencia de las mismas. Es así que, el cerdo presenta glándulas bulbouretrales, próstata y vesiculares grandes en tamaño; mientras que, en el carnero y en el toro las glándulas vesiculares son grandes, pero las bulbouretrales y la próstata son relativamente pequeñas y diseminadas (Maxwell *et al.*, 2007). Los camélidos presentan próstata y glándulas bulbouretrales, estando ausentes las glándulas vesiculares (Bravo W.P., 2014). Por otro lado, la variabilidad en la composición proteica del PS también se ha asociado a los diferentes mecanismos de eyaculación entre las especies. Por ejemplo, los rumiantes depositan un eyaculado de bajo volumen y alta concentración espermática a nivel de la vagina. El equino y el porcino depositan el semen directamente en el útero de la hembra a través de un eyaculado de alto volumen y baja concentración espermática (Druart *et al.*, 2013). Mientras que, los camélidos depositan un eyaculado filante, de bajo volumen y con un número variable de espermatozoides ($10 - 600 \times 10^6$ espermatozoides/ml) a lo largo de todo el tracto reproductivo de la hembra, llegando hasta a la unión útero-tubárica. Por lo tanto, las diferencias en la composición proteica del PS entre las especies podría ser resultado de los diferentes requerimientos que necesita el espermatozoide para interactuar con el tracto reproductivo de la hembra.

En lo que respecta a biotecnologías reproductivas aplicadas en los machos, actualmente, muchos trabajos se enfocan en estudiar el efecto del PS en los protocolos de refrigeración y congelamiento de semen. Sin embargo, todavía existen muchos interrogantes y es posible que, lo que funciona correctamente en una especie o en un individuo no funcione en otra/o. En un protocolo de

criopreservación los espermatozoides y el PS se exponen a un diluyente con el objetivo de minimizar los daños que sufren las células cuando son expuestas a las bajas temperaturas. Sin embargo, al diluir el eyaculado se diluye el efecto del PS y se desconoce si esa dilución podría afectar la funcionalidad del mismo. Por otra parte, durante el servicio natural, los espermatozoides permanecen en contacto con el PS un periodo de tiempo relativamente corto. Por ello, uno de los interrogantes cuando se congelan muestras de semen, es conocer si hay que dejar o retirar el PS; si hay que congelarlo con un cierto porcentaje de PS o si hay que agregarlo luego de descongelar las muestras. También, hay que tener en cuenta que la composición del PS varía entre los individuos de una misma especie y que, esta diferente composición podría generar que un individuo congele o refrigere semen mejor que otro.

Actualmente, existe un especial interés en determinar la composición proteica del PS y se está avanzado en comprender la acción de tales proteínas sobre la funcionalidad de los espermatozoides. El objetivo final es identificar proteínas que puedan ser beneficiosas para la formulación de medios de criopreservación con vistas a mejorar los porcentajes de preñez mediante inseminación artificial.

PLASMA SEMINAL EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Es de amplio conocimiento que el semen de los CSA presenta características particulares, incluyendo un bajo volumen y una concentración espermática variable, que limitan el número de experimentos que se puedan realizar en una mismo eyaculado (Giuliano *et al.*, 2008; Carretero *et al.*, 2015a; Bertuzzi *et al.*, 2020). Además, los espermatozoides de semen fresco presentan movilidad oscilatoria con muy baja o nula movilidad progresiva (Giuliano *et al.*, 2010). Sin embargo, son las características reológicas del PS, como la filancia y la viscosidad estructural elevada (Casaretto *et al.*, 2012) las que más importancia han tenido al definir los eyaculados de CSA. A diferencia del equino y porcino, y similar al humano y mono, en los CSA el componente viscoso del PS se deposita a lo largo de la eyaculación y es distribuido en forma homogénea en la totalidad del eyaculado, mientras que, en el porcino y el equino constituye una fracción del eyaculado, el gel (Kershaw-Young y Maxwell, 2012). Por otra parte, contrario a lo que sucede en el humano (Dunn *et al.*, 1977), la licuefacción del semen de CSA no ocurre luego de la incubación del mismo durante 30 hs a 37 °C o a temperatura ambiente (Apichela *et al.*, 2007) o demora mucho tiempo

(24-48 hs) (Garnica *et al.*, 1993). Debido a que el PS de alpaca posee elevadas cantidades de glicosaminoglicanos (GAGs), inicialmente, se asoció a los mismos con las características reológicas del semen de los CSA, pero las enzimas que degradan los GAGs no fueron efectivas para disminuir completamente la filancia (Kershaw-Young *et al.*, 2013). Mientras que, el uso de enzimas proteolíticas como papaína, proteinasa K, fibrinolisisina, tripsina y colagenasa fueron efectivas, permitiendo eliminar dicha característica (Bravo *et al.*, 2000; Giuliano *et al.*, 2010; Kershaw-Young *et al.*, 2017). Estos resultados sugieren que serían las proteínas y no los GAGs las responsables de la filancia del PS de los CSA (Kershaw-Young *et al.*, 2017). Dentro de ellas, la mucina 5B es definida como una proteína formadora de gel y sería aportada por las glándulas bulbouretrales durante la eyaculación (Apichela *et al.*, 2014). Esta proteína es 5 veces más elevada en muestras con alta filancia respecto a muestras de baja filancia (Kershaw-Young y Maxwell, 2012). Apoyando esta hipótesis, Apichela *et al.* (2014) observaron que los eyaculados provenientes de un macho al cual se le habían extirpado las bulbouretrales carecían de filancia. Por otra parte, es interesante remarcar que, Casaretto *et al.* (2012) determinaron que la filancia y la viscosidad estructural son características reológicas diferentes del PS de la llama. Estos autores no encontraron relación entre la formación de hilo (filancia) y la viscosidad estructural medida objetivamente mediante un viscosímetro; es decir, algunas de las muestras que presentaban elevada viscosidad estructural no formaban hilo al ser manipuladas. Adicionalmente, no observaron diferencias significativas en la viscosidad estructural entre muestras tratadas y no tratadas con colagenasa, sin embargo, las muestras tratadas con la enzima no presentan filancia, mientras que la misma se conservaba en las muestras no tratadas (Casaretto *et al.*, 2012). Estos resultados confirman que la viscosidad estructural y la filancia son características reológicas diferentes del PS de los CSA.

Con respecto al manejo del semen, estas características reológicas dificultan el manejo de los eyaculados y, consecuentemente, el desarrollo de protocolos de criopreservación de semen así como, de otras técnicas de reproducción asistida. Es de conocimiento que la filancia y viscosidad de los eyaculados de CSA impiden la correcta separación de los espermatozoides del PS, la dilución y homogeneización de las muestras con los diluyentes y crioprotectores, la separación en alícuotas y el envasado en las pajuelas (Carretero *et al.*, 2015a; Fumuso *et al.*, 2019). Además, algunas técnicas de evaluación de semen como la citometría de flujo no pueden utilizarse en los CSA debido a la presencia del PS. Por todas estas razones se han utilizado la centrifugación a elevada velocidad (13.400 rpm) o la incubación del semen con diferentes enzimas para

separar los espermatozoides del PS y mejorar la manipulación de las muestras, respectivamente (Bravo *et al.*, 2000; Giuliano *et al.*, 2010; Kershaw-Young y Maxwell, 2011; Morton *et al.*, 2012; Kershaw-Young *et al.*, 2013; Carretero *et al.*, 2015a; Kershaw *et al.*, 2017; Fumuso *et al.*, 2018a). Las centrifugaciones a elevada velocidad se han utilizado con el objetivo de obtener muestras de PS que posteriormente se adicionaron a espermatozoides para estudiar su efecto sobre la fisiología espermática, es decir, los espermatozoides resultantes de esas centrifugaciones no se han empleado en los diferentes experimentos, dado que, podrían estar dañados (Kershaw-Young y Maxwell, 2011; Fumuso *et al.*, 2018a)

La tripsina, fibrinolisisina y proteinasa K permitieron disminuir la filancia de los eyaculados de llama y alpaca, pero con todas se observaron efectos perjudiciales en la función espermática (Bravo *et al.*, 2000; Kershaw-Young *et al.*, 2013). Algunos estudios han reportado efectos deletéreos respecto al uso colagenasa (Morton *et al.*, 2008). Mientras que, en nuestro laboratorio la incubación de semen de llama con una solución de colagenasa (1 mg/ml) en HEPES-TALP demostró ser eficaz para eliminarla filancia de las muestras, separar los espermatozoides del PS e inducir movilidad espermática progresiva (Conde *et al.*, 2008; Giuliano *et al.*, 2010) y así, conseguir la primera preñez a nivel mundial en CSA a partir de embriones obtenidos mediante fertilización *in vitro* (Trasorras *et al.*, 2014). La diferencia entre estudios podría deberse a la concentración final de enzima utilizada, si bien Morton *et al.*, utilizaron concentraciones iniciales similares a las nuestras (1 mg/ml), la concentración final de enzima fue superior dado que utilizaron diluciones 1:1, mientras que en nuestro caso la dilución fue 1:4 (enzima:semen). La papaína, enzima presente en la papaya ha permitido reducir la filancia en muestras de semen de alpaca, sin embargo, se observó daño a nivel del acrosoma espermático cuando las muestras fueron expuestas durante 10 min a 1 hora en concentraciones de 0,5 a 4 mg/ml (Morton *et al.*, 2008). Contrariamente, Kershaw-Young *et al.* (2013) observaron que la papaína fue efectiva para reducir la filancia del semen de alpacas sin afectar la movilidad, viabilidad, acrosoma y el ADN de los espermatozoides, cuando la utilizaron a una concentración de 0,1 mg/ml, menor a la empleada por Morton *et al.* (2008). Por lo que, estos autores sugieren que la incubación con papaína podría ser utilizada previo al proceso de criopreservación para facilitar el manejo del semen. Recientemente, se ha logrado separar espermatozoides de semen fresco de llama del PS utilizando una columna de Androcoll-ETM mediante centrifugación a baja velocidad prescindiendo del uso de enzimas. Sin embargo, la recuperación espermática fue baja como para permitir obtener un adecuado pellet espermático para su criopreservación (Bertuzzi *et al.*, 2020). Interesantemente, las muestras que fueron

procesadas por dicho coloide no formaron hilo luego de resuspender el pellet obtenido en medio HEPES- Ham, sin embargo los espermatozoides conservaron la movilidad oscilatoria. Estos resultados indicarían que el patrón de movilidad de los espermatozoides de llama no estaría relacionado a la formación de hilo confirmando lo observado en un estudio previo (Fumuso *et al.*, 2018a). A su vez, estos resultados sugieren que con este procedimiento a pesar de remover el PS y perder la filancia, algunos componentes del PS podrían permanecer adheridos a la membrana espermática generando un efecto mecánico microscópico y/o una interacción molecular que impediría que los espermatozoides adquieran movilidad progresiva (Bertuzzi *et al.*, 2020).

Similar a otras especies, en los CSA se han realizado estudios para determinar la composición proteica del PS (Druart *et al.*, 2013; Sari *et al.*, 2018). Dichos trabajos determinaron que el β -NGF conforma alrededor del 15 al 45% de las proteínas totales del PS de la llama, alpaca y camello (Tanco *et al.*, 2011; Druart *et al.*, 2013; Fatnassi *et al.*, 2017). Dicho factor presente en el PS no solo estaría implicado en el proceso de ovulación de las hembras de camélidos, sino que también, podría jugar un rol sobre el espermatozoide de llama y del resto de los CSA. Sari *et al.* (2018) confirmaron mediante inmunohistoquímica la presencia del receptor del factor β -NGF (TrKA) tanto en espermatozoides epididimarios como en espermatozoides provenientes de eyaculados de llama. Sin embargo, sólo observaron presencia del β -NGF unido a la pieza media en los espermatozoides del eyaculado estando ausente en los epididimarios, indicando que dicho factor es aportado por el PS durante la eyaculación y que la próstata sería el principal sitio de producción del mismo en estas especies (Bogle *et al.*, 2018; Sari *et al.*, 2018). Además, la presencia de receptores TrKA en la pieza media, sitio de localización de las mitocondrias, podría sugerir la participación del β -NGF en el patrón de movilidad oscilatorio característico del espermatozoide de eyaculado de llama (Sari *et al.*, 2018) y posiblemente del resto los camélidos. Por otro lado, Zampini *et al.* (2017) determinaron que la proteína SL15 perteneciente a la familia de las lecitinas se encuentra en el PS de la llama y podría ser la responsable de la formación del reservorio espermático al unirse a la N- acetilgalactosamina presente en el epitelio oviductal (Apichela *et al.*, 2014). Estos autores, sirvieron hembras de llama con machos con y sin glándulas bulbouretrales observando que a las 24 hs del servicio los espermatozoides permanecían adheridos al epitelio de la unión útero tubárica sólo en hembras servidas con el macho con bulbouretrales. Mientras que, no se observaron espermatozoides adheridos a la mucosa oviductal en las hembras servidas con el macho que no tenía bulbouretrales (Apichela *et al.*, 2014). Estos resultados indican que el PS y

en particular las secreciones de las glándulas bulbouretrales participan en la formación del reservorio espermático en la llama. Teniendo en cuenta que son especies de ovulación inducida y que, en promedio la alpaca ovula a las 26 hs y la llama a las 30 hs post-servicio (San-Martin *et al.*, 1968; Ratto *et al.*, 2006), la formación de un reservorio en el tracto reproductivo de la hembra que permita mantener a los espermatozoides viables a la espera del ovocito, resulta crítico en estas especies.

EFECTO DEL PLASMA SEMINAL SOBRE ESPERMATOZOIDES DE SEMENFRESCO DE CSA

Dada la importancia del PS en los CSA se han realizado algunos estudios que evalúan el efecto del mismo sobre espermatozoides epididimarios o de semen fresco en estas especies. Un trabajo realizado en alpacas reporta que una concentración final de 10% de PS conserva la movilidad espermática, la integridad acrosómica y la viabilidad de espermatozoides de epidídimo y de semen fresco durante 3 horas de incubación a 37 °C (Kershaw-Young y Maxwell, 2011). Un estudio realizado en nuestro laboratorio en semen fresco de llama obtenido mediante electroeyaculación (**Figura 1**), evidenció que el PS está involucrado en el patrón de movilidad de los espermatozoides. En dicho trabajo observamos que cuando se resuspendió el pellet de espermatozoides con PS, luego de haber adquirido un patrón progresivo de movilidad a partir de una incubación enzimática, los mismos retomaban el patrón de movilidad oscilatoria (MO) característico del semen fresco. En cambio, si se utiliza un medio diferente al PS, como el HEPES-TALP (HT) para resuspender el pellet, la movilidad espermática era mayormente progresiva y con mayor vigor. A su vez se observó un descenso significativo de la movilidad total (MT) a las 3 hs de incubación en las muestras con PS, mientras que se conservó en las muestras resuspendidas en HT (Carretero *et al.*, 2015b). Con el objetivo de evaluar otros porcentajes de PS, realizamos un estudio utilizando 0, 10, 50 y 100% de PS en HT e incubando las muestras a 37 °C durante 3 hs (Fumuso *et al.*, 2018a). Similar al experimento anterior, las muestras con bajos porcentajes de PS (0 y 10%) presentaron mayores porcentajes de movilidad progresiva (MP). Las muestras incubadas con 100% de PS presentaron sólo MO mientras que, las incubadas con 50% de PS presentaron ambos tipos de movilidad (MO y MP). Por otra parte, la MT de las muestras con 0, 10 y 50% de PS se conservó a lo largo de las 3 hs de incubación mientras que, similar al estudio previo, se observó un descenso significativo de la misma en las muestras con 100% PS. Estos resultados

permitieron validar el trabajo anterior y demostraron que, según el porcentaje de PS agregado a los espermatozoides de semen fresco de llama, varía el patrón de movilidad que predomina en las muestras. Es así como, las muestras incubadas con mayores porcentajes de PS presentaron mayores porcentajes de espermatozoides con MO. Mientras que, las muestras con menores porcentajes de PS presentaron mayores porcentajes de espermatozoides con MP. El patrón de MO característico de los espermatozoides de CSA ha sido atribuido a las características reológicas particulares del semen de estas especies. Es así que, se ha propuesto que el PS ejercería un efecto mecánico sobre los espermatozoides impidiendo que se desplacen en forma progresiva y sólo oscilen en el lugar (Lichtenwalner *et al.*, 1996; Von Baer y Helleman 1998; Bravo *et al.*, 1999; Brown B.W., 2000). Sin embargo, podrían existir interacciones más complejas entre los espermatozoides de estas especies y el PS, donde diversos componentes del mismo podrían actuar a nivel molecular sobre la membrana y/o incluso tener una acción bloqueando la movilidad de los espermatozoides. Reforzando dichas hipótesis, se ha observado que la simple dilución de los eyaculados de llama no induce a los espermatozoides a adquirir MP (Giuliano *et al.*, 2010). A su vez, se observó que el uso de medios de criopreservación con yema de huevo, permiten que los espermatozoides de llama adquieran MP, aún cuando las muestras diluidas conservan las características reológicas propias de los eyaculados de los CSA como la filancia (Bravo y col., 1996; Giuliano S.M., observación personal; Fumuso *et al.*, 2019). Como se mencionó previamente, al separar espermatozoides de semen fresco de llama no tratado enzimáticamente del PS mediante el pasaje a través de Androcoll-ETM, observamos que los espermatozoides conservaron la MO (Bertuzzi *et al.*, 2020). Pensamos que, a pesar de remover el PS mediante el coloide y, consecuentemente, perder la filancia; algunos componentes del PS podrían permanecer adheridos a la membrana espermática generando un efecto mecánico microscópico y/o una interacción molecular que impediría que los espermatozoides adquieran movilidad progresiva (Bertuzzi *et al.*, 2020). Todas estas observaciones (Bravo *et al.*, 1996; Giuliano S.M, observación personal; Bertuzzi *et al.*, 2020) se respaldan con los resultados de Fumuso *et al.* (2018a), quienes observaron MO en muestras con ausencia de filancia (50% de PS a las 3 hs) e incluso también se observaron espermatozoides con un patrón de movilidad oscilatorio en muestras sin PS (0% de PS a las 0; 1,5 y 3 hs), reforzando una hipótesis de tipo molecular más que mecánica para la acción del PS sobre la movilidad de los espermatozoides de llama. Por otra parte, Fumuso *et al.* (2018a) observaron que los espermatozoides incubados con 0, 10 y 50% de PS conservaron la funcionalidad de la membrana y la viabilidad a lo largo de la

incubación, mientras que, se observaron un descenso de ambas características a las 3 hs de incubación en las muestras con 100% de PS.

Además, a las 3 hs de incubación, las muestras que presentaron el mayor porcentaje de espermatozoides vivos con sus acrosomas intactos fueron las incubadas con 50%PS, aunque esta diferencia no fue significativa. Es interesante remarcar también que, en todos los tiempos de incubación, las muestras con bajas concentraciones de PS (0 y 10%) tuvieron un mayor porcentaje de espermatozoides vivos con acrosomas reaccionados respecto a las muestras con altas concentraciones de PS (Fumuso *et al.*, 2018a). Estos resultados indicarían que la ausencia de PS o su presencia en bajo porcentaje en presencia de HT, sería beneficioso para que los espermatozoides reaccionen, conserven su viabilidad y se puedan utilizar en un protocolo de fertilización *in vitro* (FIV). La obtención de embriones de llama por FIV, prescindiendo de la utilización de agentes capacitantes y utilizando espermatozoides de semen fresco en ausencia de PS refuerzan esta hipótesis (Conde *et al.*, 2008; Trasorras *et al.*, 2012; 2014). Además, los mayores porcentajes de espermatozoides con acrosomas reaccionados se observaron en las muestras sin PS (0%), tanto en las muestras evaluadas con FITC-PNA/PI (Fluorescein Isothiocyanate-*Arachis hypogea* agglutinin/Propidium Iodide) como en aquellas teñidas con Coomassie Blue (**Figura 2**). Estos resultados, indicarían que sería necesario agregar un cierto porcentaje de PS para evitar la reacción acrosomal espontánea (Fumuso *et al.*, 2018a). Reforzando esta hipótesis, en porcinos se observó que la adición de 10% de PS a los medios de fertilización *in vitro* evitó la penetración espermática en los ovocitos, sugiriendo que esta inhibición podría ser causada por los factores decapacitantes del PS (Suzuki *et al.*, 2002). A su vez, Kershaw-Young y Maxwell (2011) observaron menores porcentajes de acrosomas intactos en espermatozoides epididimarios de alpaca incubados sin PS (0%) respecto a las muestras incubadas con 10 y 100%. Estos estudios y el nuestro, donde las muestras con mayores porcentajes de PS presentaron mayores porcentajes de espermatozoides con acrosomas intactos, refuerzan la idea de que factores presentes en el PS podrían inhibir reversiblemente el proceso de capacitación y que la ausencia de tales factores podrían llevar a una capacitación espontánea y consecuente reacción acrosomal.

En otro estudio, evaluamos el efecto de diferentes porcentajes de PS (0, 10 y 50%) sobre espermatozoides de semen fresco de llama diluidos en lactosa - yema de huevo (LY) a tiempo 0 hs (Carretero *et al.*, 2016). Esto se realizó con el objetivo de determinar si el efecto del PS en LY era similar al que se observó cuando diluimos los espermatozoides con PS en HT. A pesar de presentar diferentes

porcentajes de PS, en todas las muestras se observó un patrón progresivo de movilidad, siendo prácticamente nula la movilidad oscilatoria. Como se mencionó previamente, la yema de huevo induciría un cambio en el patrón de movilidad de los espermatozoides de llama, pudiendo el predominio de MP en todas las muestras aún en aquellas con 50% de PS, deberse a la yema de huevo del medio de dilución. Por otra parte, a diferencia de lo que observamos en las muestras diluidas en HT, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosomas intactos entre las diferentes concentraciones de PS evaluadas (0, 10 y 50%). Esta diferencia en los resultados entre las muestras diluidas en HT y las diluidas en LY, podrían deberse a que la yema de huevo podría interactuar con factores capacitantes del PS y de esta manera, impedir la capacitación y reacción acrosomal.

A partir de los resultados observados en nuestros estudios respecto al efecto del plasma seminal en los espermatozoides de semen fresco de llama podemos concluir que:

- El patrón de movilidad del espermatozoide de semen fresco de llama está influenciado por el plasma seminal y por la proporción en que éste se encuentra presente en el medio.
- La presencia de movilidad oscilatoria en muestras sin filancia, como las procesadas por Androcoll-ETM y diluidas en HEPES-ham, indicarían que el efecto que ejerce el PS sobre la movilidad de los espermatozoides se produciría mediante una acción de tipo molecular más que mecánica.
- La presencia de yema de huevo en el medio de dilución induciría a los espermatozoides de llama a moverse progresivamente aún en muestras con 50% de PS.
- Sería necesario agregar a los medios un cierto porcentaje de plasma seminal que ejerza un rol decapacitante para evitar la reacción acrosomal espontánea en los espermatozoides de semen fresco de llama.
- El uso de 100% de plasma seminal no es capaz de mantener a los espermatozoides de semen fresco de llama móviles, viables y con sus membranas funcionales durante 3 hs. Determinando que es necesario incorporar un medio de sostén a los espermatozoides además del plasma seminal para mantener a los mismos viables y funcionales en el tiempo.
- La yema de huevo presente en el medio de dilución podría prevenir la capacitación espermática y consecuente reacción acrosomal en los espermatozoides de semen fresco de llama.



Figura 1. Maniobra de extracción de semen de llama bajo anestesia general, vástago de estimulación y equipo de electroeyaculación (Director *et al.*, 2007).

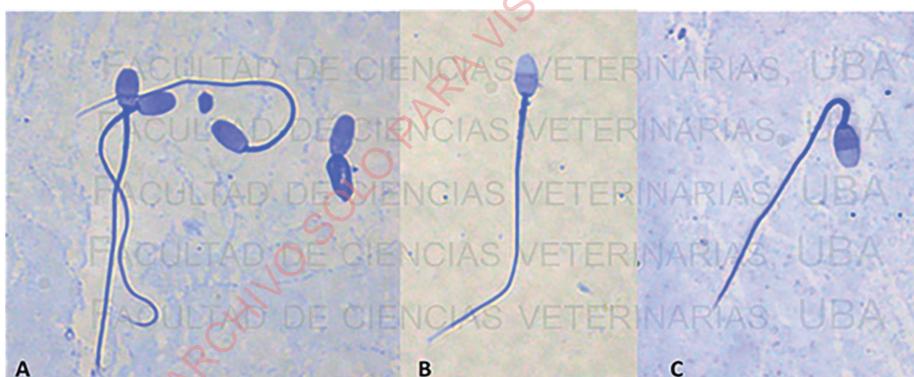


Figura 2. Espermatozoides de llama teñidos con la tinción de Azul de Coomassie (Coomassie Blue) utilizada para evaluar el acrosoma mediante microscopía óptica (1000X). **A:** espermatozoides con acrosomas presentes (teñidos), **B** y **C:** espermatozoides sin acrosomas (no teñidos).

EFEECTO DEL PLASMA SEMINAL EN ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE CSA

En muchas especies, el PS es rutinariamente diluido o removido durante el proceso de criopreservación de los espermatozoides; esto puede tener efectos positivos o negativos sobre la función espermática y la fertilidad (Maxwell *et al.*, 2007). También, el PS ha sido agregado luego del proceso de criopreservación con el fin de preservar la sobrevivencia espermática en el tiempo (Nöthling *et al.*,

2005; O' Meara *et al.*, 2007; Sabatini *et al.*, 2014). En los CSA, la mayoría de los protocolos de criopreservación de semen utilizados no remueven el PS durante el procesamiento de las muestras, es decir el diluyente es agregado al eyaculado completo (Bravo *et al.*, 1996; Aller *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2003; Santiani *et al.*, 2013; Giuliano y col., 2012; Carretero *et al.*, 2015a, Stuart *et al.*, 2019). Sin embargo, como se mencionó previamente, las características reológicas del semen de los CSA dificultan la homogenización de las muestras con los diluyentes, es por esto que, muchos de los estudios mencionados utilizaron enzimas proteolíticas como la colagenasa y la papaína que facilitan la manipulación de las muestras de semen a criopreservar (Carretero *et al.*, 2015a; Stuart *et al.*, 2019).

Los primeros estudios en los que evaluamos el efecto del PS en la criopreservación de semen de llama se realizaron en el 2017 y tuvieron como objetivo evaluar el efecto del PS y de una solución de colagenasa sobre espermatozoides refrigerados y congelados de llama (Carretero *et al.*, 2017a, 2017b). Los protocolos de conservación de las muestras fueron: en presencia de PS y colagenasa (protocolo A) y en ausencia de PS y colagenasa (protocolo B). Con respecto a la refrigeración, ambos protocolos preservaron la viabilidad y funcionalidad de membranas. El protocolo A mostró menor movilidad (total y progresiva) y el protocolo B mayor porcentaje de espermatozoides con cromatina descondensada (Carretero *et al.*, 2017a). Estos resultados muestran que la refrigeración de semen de llama utilizando el protocolo A resulta ser más sencilla para trabajar a campo, ya que no requiere centrifugar las muestras para eliminar el PS. Sin embargo, sería necesario probar ambos protocolos mediante inseminación artificial (IA) para determinar tasas de preñez. Con respecto al congelamiento profundo, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas (movilidad, viabilidad y estado acrosomal) entre el protocolo A y el B. Zea *et al.* (2015) tampoco observaron diferencias significativas en la movilidad, viabilidad y funcionalidad de membranas en espermatozoides de alpaca obtenidos por desviación de conducto deferente y criopreservados en presencia y ausencia de PS. De forma similar, Jiménez *et al.* (2016) no observaron diferencias significativas en la movilidad, viabilidad y potencial de membrana en espermatozoides de epidídimo de alpaca congelados con diferentes concentraciones de PS (0, 5, 10 y 15%). Sin embargo, a diferencia de la refrigeración, en las muestras congeladas observamos un descenso significativo de todas las variables espermáticas evaluadas con respecto al semen fresco (Carretero *et al.*, 2017b).

La criopreservación de semen produce cambios irreversibles en los espermatozoides como: pérdida de la integridad de la membrana (Rasul *et*

al., 2001), daños en el acrosoma (Jones y Stewart, 1979), alteraciones del ADN (Linfor y Meyers, 2002; Carretero *et al.*, 2015a) y modificaciones del citoesqueleto (Holt y North, 1991). Se ha postulado que los factores “decapitantes” del PS se unirían a la superficie espermática retardando o previniendo la capacitación espermática (Maxwell *et al.*, 2007). Como mencionamos previamente, sería necesario agregar un cierto porcentaje de PS al medio para evitar la reacción acrosomal espontánea en espermatozoides de semen fresco de llama. A partir de estos resultados, nos resultó interesante evaluar si lo mismo sucede en los espermatozoides congelados- descongelados de llama. Para corroborar esto se diseñaron dos experimentos en los cuales se evaluó el efecto del agregado de diferentes porcentajes de PS (0, 10 y 50%) previo a la criopreservación (Fumuso *et al.*, 2019) y al descongelamiento de las muestras (Fumuso *et al.*, 2020).

En lo que respecta al agregado de PS previo al proceso de criopreservación, similar a estudios previos, observamos una disminución significativa en la movilidad espermática, funcionalidad de membrana y en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosomas intactos en las muestras congeladas con 0, 10 y 50% de PS con respecto al semen fresco. También observamos un aumento en el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosomas reaccionados en las muestras descongeladas indicando que, el protocolo de congelamiento-descongelamiento utilizado induce cambios similares a la capacitación, fenómeno llamado “criocapitación” como se ha observado en la criopreservación de espermatozoides de otras especies (ovino: Pérez *et al.*, 1996; porcino: Maxwell y Johnson, 1997; bovino: Cormier *et al.*, 1997 y equino: Neild *et al.*, 2003). Previo al congelamiento, no se observó formación de hilo (filancia) en las muestras sin PS, mientras que, se observó filancia en dos de las muestras diluidas con 10% de PS y en siete de las muestras con 50% de PS. A pesar de presentar filancia, sólo en cuatro muestras diluidas con 50% de PS se observó MO (rango: 5 - 40%). Como se mencionó previamente, atribuimos este comportamiento a la presencia de yema de huevo en el diluyente de criopreservación que induciría a los espermatozoides de llama a moverse progresivamente. Además, la yema de huevo podría unirse a las membranas de los espermatozoides y así interferir con el efecto del PS. Esto último se refuerza con el hecho de que no observamos diferencias significativas en la MP entre las muestras diluidas con los diferentes porcentajes de PS (0, 10 y 50%).

Al comparar las características de las muestras descongeladas, se observó formación de hielo en una de las muestras que había sido congelada con 10% de PS y en siete de las muestras que se congelaron con 50% de PS. Por otra parte,

se observaron mayores porcentajes de espermatozoides con MP y MT en las muestras congeladas con 0 y 10% de PS respecto a las congeladas con 50% de PS. Sin embargo, no observamos diferencias en la funcionalidad de membrana, viabilidad, estado acrosomal y el ADN entre las muestras descongeladas (**Figura 3**) (Fumuso *et al.*, 2019).

Respecto al efecto del agregado de PS a las muestras luego del descongelamiento, en este estudio los eyaculados fueron incubados con colagenasa, se centrifugaron y el pellet obtenido se resuspendió en un diluyente para su congelamiento. Luego, las muestras se descongelaron y se agregaron diferentes porcentajes de PS: 0, 10 y 50% y se incubaron a 37 °C durante 3 hs, realizando evaluaciones a las 0; 1,5 y 3 hs. La incubación (37 °C) y la evaluación de los espermatozoides en el tiempo (3 hs) se realizó con el objetivo de acercarnos a las condiciones biológicas que experimenta el espermatozoide en el tracto reproductivo de la hembra luego de la IA. Similar al estudio anterior, observamos una disminución significativa en la movilidad espermática, funcionalidad de membrana y en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosomas intactos en las muestras congeladas-descongeladas con respecto al semen fresco. A diferencia del estudio anterior, ninguna de las muestras descongeladas (0, 10 y 50% de PS) presentó filancia en ninguno de los tiempos de evaluación (0; 1,5 y 3 hs). Sólo se observó MO en las muestras con 50% de PS a las 3 hs de incubación, aunque la misma fue prácticamente nula ($0,2 \pm 1,8\%$). Este resultado fue inesperado, dado que esperábamos observar mayor porcentaje de espermatozoides con MO en las muestras con el agregado de 50% de PS. Se ha reportado en algunas especies que la criopreservación modifica la membrana plasmática de los espermatozoides a nivel estructural, alterando ambos la fluidez y la composición bioquímica, y muchos de esos cambios podrían ser irreversibles (Bailey *et al.*, 2000; Watson, P.F., 2000). Estos cambios podrían afectar sitios de acción del PS en la membrana y esto podría parcialmente explicar la falta de MO observada en las muestras con mayores porcentajes de PS. Una de las proteínas que podría estar relacionada con el patrón de movilidad es el β -NGF presente en altas concentraciones en el PS de camélidos (Druart *et al.*, 2013). Castellini *et al.* (2019) reportaron que el espermatozoide de conejo posee dos receptores de β -NGF (TrKA y p75NTR), y que ambos se relacionan con la movilidad espermática. Como se mencionó previamente, aunque observamos una influencia del PS en el patrón de movilidad del espermatozoide de semen fresco de llama (Carretero *et al.*, 2015b; Fumuso *et al.*, 2018a), aún no se ha explorado el efecto del β -NGF en los patrones de movilidad de los camélidos. Sin embargo, la presencia de uno de los receptores en la pieza media del espermatozoide de llama (Sari *et al.*, 2018) sugiere una

posible implicancia del factor en el patrón de movilidad de los espermatozoides de CSA. En este sentido, la criopreservación podría modificar el receptor del β -NGF en la membrana espermática modificando el patrón de movilidad, esta hipótesis necesita ser estudiada. Otra explicación para la casi nula MO, podría ser la yema de huevo en el diluyente que como mencionamos no sólo induciría a los espermatozoides de llama a adquirir un patrón progresivo de movilidad, sino que además podría interferir con los factores del PS (Fumuso *et al.*, 2019). También, observamos una disminución en el porcentaje de espermatozoides con membranas funcionales en las diferentes muestras (0, 10 y 50 % de PS) a lo largo del tiempo. No se observaron diferencias en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosomas intactos entre las diferentes muestras en los tiempos evaluados, sin embargo, se observó un aumento en el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosomas reaccionados a las 3 hs de incubación respecto a la hora 0. Se ha reportado que proteínas del PS pueden prevenir la capacitación al unirse al espermatozoide y estabilizar las membranas (Maxwell *et al.*, 2007; Muiño-Blanco *et al.*, 2008). Como ya mencionamos, el congelamiento-descongelamiento de las muestras producen cambios en la membranas de los espermatozoides y estos cambios pueden predisponer a que las células reaccionen espontáneamente, un fenómeno llamado “criocapacitación” observado en diferentes especies e incluso en la llama (Fumuso *et al.*, 2019). Cambios observados en la membrana de espermatozoides de conejo que fueron inducidos a sufrir la reacción acrosomal (Castellini *et al.*, 2019), refuerzan la hipótesis de que la criopreservación podría modificar sitios específicos de acción de los factores decapacitantes del PS. Estos autores observaron una disminución en aproximadamente un 50% de las células positivas al TrKA en las muestras inducidas respecto a las no inducidas. Nuevamente, el PS no podría ejercer su rol protector en los espermatozoides congelados-descongelados de llama debido a modificaciones en los receptores de la membrana a consecuencia de la criopreservación.

A partir de los resultados observados en nuestros estudios respecto al efecto del plasma seminal en espermatozoides criopreservados de llama podemos concluir que:

- Ambos protocolos de refrigeración utilizados, tanto en presencia como ausencia de plasma seminal y colagenasa, conservaron la viabilidad y funcionalidad de membrana de los espermatozoides de llama.
- La adición de PS (10 y 50%) previo al proceso de criopreservación de espermatozoides de llama, con el diluyente base utilizado y la curva de

congelamiento profundo empleada, no tendría un efecto protector frente al daño por congelamiento.

- La adición post-descongelación de 10% y 50% de plasma seminal fue incapaz de preservar la movilidad espermática o mejorar la supervivencia de los espermatozoides congelados-descongelados de llama.
- Se observó formación de hilo en muestras que no tenían movilidad oscilatoria, reforzando la idea que la filancia y el patrón de movilidad son características independientes en el semen de los CSA.
- Los diluyentes que contienen yema de huevo inducen a los espermatozoides congelados-descongelados de llama a moverse progresivamente, aún en muestras que presentan filancia.
- Los protocolos de criopreservación utilizados generarían un estado de “criocapacitación” en los espermatozoides de llama y consecuentemente los acrosomas reaccionarían espontáneamente.
- Los protocolos de criopreservación utilizados podrían modificar sitios de la membrana espermática impidiendo que el PS cumpla su función.

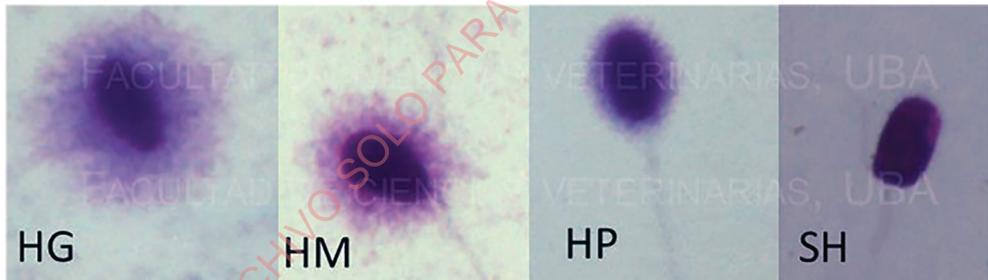


Figura 3. Espermatozoides de llama evaluados con la técnica del halo o de dispersión de la cromatina espermática (SCD: Sperm Chromatin Dispersion): **HG)** Espermatozoide con halo grande, **HM)** Espermatozoide con halo mediano, **HP)** Espermatozoide con halo pequeño y **SH)** Espermatozoide sin halo (1000x). Las categorías HG y HM corresponden a espermatozoides con ADN intacto, mientras que HP y SH corresponden a espermatozoides con ADN fragmentado.

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN CONGELADO

En los CSA, el uso de la IA con semen criopreservado es una biotecnología escasamente utilizada debido a los bajos índices de preñez que se obtienen con la misma, limitando su aplicación a campo. A su vez, existen pocos reportes que, además de las pruebas de diagnóstico *in vitro* realicen pruebas biológicas con semen congelado.

Debido a que ninguno de los protocolos de criopreservación que utilizamos mostró superioridad sobre el otro al evaluar el efecto del PS sobre las características espermáticas *in vitro* (Fumuso *et al.*, 2019; 2020) se decidió inseminar con el protocolo más sencillo (0% de PS). Para ello se utilizó un diluyente a base de lactosa-yema de huevo con 7% de dimetilformamida y un protocolo de congelamiento profundo que incluye un descenso rápido de la temperatura (**Figura 4**). Se utilizó Receptal[®] (Buserelina) para inducir la ovulación de las hembras que presentaron un folículo ≥ 7 mm en fase de crecimiento. Realizamos la IA una vez confirmada la ovulación mediante ultrasonografía debido a que, previamente se observó preñez con semen refrigerado de llama sólo en aquellas hembras en las que se había inseminado una vez confirmada la ovulación (Giuliano *et al.*, 2012). La dosis inseminante se depositó en la cercanía de la papila uterina en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con el folículo ovulatorio. Por esta razón y porque la IA se realizó sobreovulación se decidió no incorporar PS durante la IA, dado que no sería necesaria la formación de un reservorio espermático oviductal. Los porcentajes de preñez utilizando dicha metodología fueron del 0%, siendo el intervalo desde la inducción hasta la detección de la ovulación de $28,8 \pm 1,0$ hs (Fumuso *et al.*, 2018b). Vaughan *et al.* (2003) tampoco observaron preñez al inseminar alpacas con semen congelado utilizando dos diluyentes comerciales (Green/clear camel buffer[®] y Biladyl A&B[®]), ambos con glicerol al 7 %. Estos autores realizaron la IA a tiempo fijo 24 a 30 hs posteriores a la inducción de la ovulación con buserelina, confirmando la misma en la totalidad de las hembras por la presencia del cuerpo lúteo 7 días después de la inducción. A su vez, la dosis inseminante se depositó en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con la presencia de folículo dominante, de forma similar a nuestro estudio. Al descongelar las muestras con ambos diluyentes la movilidad espermática observada fue similar a los valores obtenidos en nuestro estudio: $22,5 \pm 9,3\%$ versus Green/clear camel buffer[®] $17,4 \pm 7,1\%$; y Biladyl A&B[®] $21,3 \pm 3,3\%$ (media \pm DE). Otro reporte realizado en la Puna Argentina logró un 7,9% de preñez al inseminar a 38 hembras de llama a tiempo fijo con semen congelado (24 hs pos-inducción de la ovulación) (Aller *et al.*, 2003). Similar a nuestros resultados, estos autores observaron un descenso significativo en la movilidad y la viabilidad espermática al comparar las muestras descongeladas con el semen fresco. El diluyente utilizado en este estudio estaba compuesto por yema de huevo, citrato, glucosa y antibióticos, agregando como crioprotectores glicerol al 6% y dimetilsulfóxido al 8%. Cabe destacar que, en este estudio se indujo la ovulación de las hembras de llama con buserelina, sin la previa determinación de la presencia de un folículo dominante ni por palpación ni por ultrasonografía transrectales. Además, utilizaron una dosis de 25 millones

de espermatozoides totales con una movilidad del 20 al 25%, reportando una dosis inseminante de $8,4 \pm 3,2$ millones de espermatozoides viables (media \pm DE). Dichos valores son similares a los utilizados en nuestro estudio en el que el número de espermatozoides viables totales inseminados fue de $9,4 \pm 7,6 \times 10^6$ espermatozoides/ml (media \pm DE).

Otros autores publicaron preñeces en alpaca utilizando semen congelado-descongelado (Bravo *et al.*, 1996), logrando un 26,3% de preñez utilizando también, un medio a base de yema de huevo, glucosa, citrato y glicerol al 7%. Dicho trabajo al igual que el de Aller *et al.* (2003) utilizó una curva lenta de congelamiento con periodos de equilibrio desde 45 minutos hasta 2 horas de duración a 4-5 °C. En nuestro estudio utilizamos un equilibrio a temperatura ambiente y una curva rápida de descenso de temperatura durante el congelamiento (Fumuso *et al.*, 2018b). Se desconoce la cantidad de espermatozoides viables necesarios para lograr preñeces en CSA con semen congelado. En semen fresco de llama diluido con lactosa y yema de huevo una dosis inseminante de 12 millones de espermatozoides vivos totales son suficientes para lograr preñez (Giuliano *et al.*, 2012). Sin embargo, en nuestro estudio al inseminar una cantidad similar de espermatozoides vivos congelados/descongelados (9,4 millones de espermatozoides vivos totales) no se obtuvieron preñeces. Giuliano *et al.* (2012) reportan que para lograr preñez con semen refrigerado de llama es necesario utilizar una dosis \geq a 76 millones de espermatozoides vivos totales. Es posible que la sobrevivencia de un espermatozoide criopreservado sea menor a la de un espermatozoide de semen fresco procesado para ser inseminado, por lo que sería necesario aumentar el número de espermatozoides vivos al inseminar con semen congelado.



Figura 4. Congelamiento de semen de llama mediante protocolo de Carretero *et al.* (2015).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams GP, Ratto MH, Huanca W, Singh J. 2005. Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biol Reprod* 73:452- 457.
- Aller JF, Rebuffi GE, Cancino AK, Alberio H. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la movilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Arch. Zootec.* 52:15-23.
- Apichela S, Chaves G, Trasorras V, Carretero MI, Pinto M, Rutter B, Jiménez Díaz M, Agüero A, Miceli DC. 2007. Bulbourethral glands secretions involvement in llama oviduct sperm reservoir formation. *Biocell* 31(2):295.
- Apichela S, Argañaraz ME, Giuliano S, Zampini R, Carretero I, Miragaya M, Miceli D. C. 2014. Llama oviductal sperm reservoirs: Involvement of bulbourethral glands. *Andrología* 46: 290-295.
- Bailey JL, Biloudeu JF, Cormier N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals. A damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 21:1-7.
- Bertuzzi ML, Fumuso FG, Giuliano SM, Miragaya MH, Gallelli MF, Carretero MI. 2020. New protocol to separate llama sperm without enzymatic treatment using Androcoll-E™. *Reprod Domest Anim.* Doi: 10.1111/rda.13755.
- Bogle OA, Carrasco RA, Ratto MH, Singh J, Adams GP. 2018. Source and localization of ovulation-inducing factor/nerve growth factor in male reproductive tissues among mammalian species. *Biol Reprod* 99(6):1194-1204.
- Bravo PW, Ordoñez C, Alarcón V. 1996. Semen processing and freezing of alpacas and llamas. In: 13th International Congress on animal Reproduction (ICAR), Sydney, Australia.
- Bravo PW, Pacheco C, Quispe G, Vilcapaza L, Ordoñez C. 1999. Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. *Arch Androl* 43:39-246.
- Bravo PV, Callo P, Garnica J. 2000. The effect of enzymes on semen viscosity in Llamas and Alpacas. *Small Rum Res* 38:91-95.
- Bravo PW. Reproductive anatomy and physiology in the male. In: Llama and alpaca care. Medicine, surgery, reproduction, nutrition and Herd Health. Cebra C, Anderson DE, Tibary A, Van Saun RJ, Johnson LW. First edition, 2014. Editorial Elsevier.
- Bromfield JJ. 2014. Seminal fluid and reproduction: much more than previously thought. *J Assist Reprod Genet* 17:17.

- Brown BW. 2000. A review on reproduction in South American camelids. *Anim Reprod Sci* 58:169-195.
- Carretero MI, Neild D, Ferrante A, Caldevilla M, Arraztoa C, Fumuso F, Giuliano S. 2015a. Effect of cryoprotectant and equilibration temperature on *Lama glama* sperm cryopreservation. *Andrología* 47:685-693.
- Carretero M, Fumuso F, Miragaya M, Herrera C, Giuliano S. (2015b). Effect of seminal plasma in *Lama glama* sperm. *Reprod Fertil Dev* 27(1):223.
- Carretero MI, Fumuso FG, Giuliano SM. 2016. Efecto del plasma seminal en la conservación de semen en especies de uso zootécnico. *Spermova* 6(2):93-98. Review.
- Carretero MI, Giuliano SM, Arraztoa CC, Santa Cruz RC, Fumuso FG, Neild DM. 2017a. Comparison of two cooling protocols for llama semen: With and without collagenase and seminal plasma in the medium. *Andrologia* 49, e12691.
- Carretero MI, Fumuso FG, Chaves MG, Miragaya MH, Neild DM, Cetica P, Giuliano SM. 2017b. Comparison of two freeze thawing protocols for llama semen: with and without collagenase and seminal plasma in the medium. Preliminary results. *InVet* 19:57.
- Casaretto C, Martínez Sarrasague M, Giuliano S, Rubin de Celis E, Gambarotta M, Carretero MI, Miragaya M. 2012. Evaluation of *Lama glama* semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer. *Andrologia* 44:335-341.
- Castellini C, Mattioli S, Dal Bosco A, Collodel G, Pistilli A, Stabile AM, Macchioni L, Mancuso F, Luca G, Rende M. 2019. *In vitro* effect of nerve growth factor on the main traits of rabbit sperm. *Reprod Biol Endocrinol* 17(1):93.
- Cormier S, Sirard MA, Bailey JL. 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl* 18: 461-468
- Conde PA, Herrera C, Trasorras VL, Giuliano SM, Director A, Miragaya MH, Chaves MG, Sarchi MI, 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. *Anim Reprod Sci* 109:298-308.
- Chang MC. 1957. A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature* 179:258-259.
- Dacheux JL, Paquignon M. 1980. Relations between the fertilizing ability, motility and maturation process in the boar. *Annals N Y Acad Sci* 438:526-529.

- Dacheux JL, Castella S, Gatti JL, Dacheux F. 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* 63(2):319-341.
- Director A, Giuliano S, Trasorras V, Carretero I, Pinto M, Miragaya M (2007). Electroejaculation in llama (*Lama glama*). *J Camel Prac Res* 14(2):203-206.
- Dunn PF, Picologlou BF. 1977. Variation in human semen viscoelastic properties with respect to time post ejaculation and frequency of ejaculation. *Int J Fertil* 22:217-224.
- De Graaf S, Rickard J, Pini T, Maddison J, Druart X, Leahy T. 2014. Emerging Roles of Seminal Plasma in Sperm Function. 9th Biennial Conference of the Association for Applied Animal Andrology, Newcastle: Association for Applied Animal Andrology 93-101.
- Druart X, Rickard JP, Mactier S, Kohnke PL, Kershaw-Young CM, Bathgate R, Gibb Z, Crossett B, Tsikis G, Labas V, Harichaux G, Grupen CG, de Graaf SP. 2013. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *J Proteomics* 95:13-22.
- Fatnassi M, Cebrinprez J, Salhi I, Prezp R, Seddik M, Casao A, Khorchani T, Muiño-Blanco T, Hammadi M. (2017). Identification of β -nerve growth factor in dromedary camel seminal plasma and its role in induction of ovulation in females. *Emirates J Food Agriculture*, 29(4):293-299.
- Fumuso FG, Giuliano SM, Chaves MG, Neild DM, Miragaya MH, Gambarotta MC, Carretero MI. 2018a. Seminal plasma affects the survival rate and motility pattern of raw llama spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 192:99-106.
- Fumuso FG, Arraztoa CC, Chaves MG, Neild DM, Giuliano SM, Miragaya MH, Carretero MI. 2018b. Inseminación artificial de llamas con semen congelado. *Resultados preliminares. Invet*, 20(1):124.
- Fumuso FG, Giuliano SM, Chaves MG, Neild DM, Miragaya MH, Carretero MI. 2019. Evaluation of the cryoprotective effect of seminal plasma on llama (*Lama glama*) spermatozoa. *Andrología*, 51,e13270.
- Fumuso FG, Chaves G, Neild DM, Miragaya MH, Bertuzzi ML, Carretero MI. 2020. Incubation of frozen-thawed llama sperm with seminal plasma. *Andrologia* 2020;00:e13597.
- Garnica J, Achata R, Bravo PW. 1993. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Anim Reprod Sci* 32:85-90.

- Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. 2008. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). Anim Reprod Sci 104:359-369.
- Giuliano SM, Carretero MI, Gambarotta MC, Neild DM, Trasorras VL, Pinto M, Miragaya MH. 2010. Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. Anim Reprod Sci 118(1):98-102.
- Giuliano SM, Chaves MG, Trasorras VL, Gambarotta M, Neild D, Director A, Pinto M, Miragaya M.H. 2012. Development of an artificial insemination protocol in llamas using cooled semen. Anim Reprod Sci 131:204-210.
- Gwathmey TM, Ignatz GG, Mueller JL, Manjunath P, Suarez SS. 2006. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. Biol Reprod 75:50-507.
- Holt WV, North RD. 1991. Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. J Reprod Fertil 91:451-461.
- Jiménez J, Román B, Zurita R, Ugarelli A, Santiani A, Evangelista S. 2016. The effect of seminal plasma concentrations on the oxidative damage in epididimal thawed alpaca spermatozoa. Preliminary assay. Spermova 6(1):82.
- Jones RC, Stewart DL. 1979. The effects of cooling to 5 °C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. J Reprod Fertil 56:233-238.
- Kershaw-Young CM, Maxwell WMC. 2011. The effect of seminal plasma on alpaca sperm function. Theriogenology 76:1197-1206.
- Kershaw-Young CM, Maxwell WMC. 2012 Seminal plasma components in Camelids and Comparisons with other species. Reprod Dom Anim 47(4):369-375.
- Kershaw-Young CM, Stuart C, Evans G, Maxwell W. 2013. The effect of glycosaminoglycan enzymes and proteases on the viscosity of alpaca seminal plasma and sperm function. Anim Reprod Sci 138:261-267.
- Kershaw CM, Evans G, Rodney R, Maxwell WMC. 2017. Papain and its inhibitor E-64 reduce camelid semen viscosity without impairing sperm function and improve post-thaw motility rates. Reprod Fertil Dev 29:1107-1114.
- Leahy T, Evans G, Maxwell WMC, Marti JI. 2010. Seminal plasma proteins do not consistently improve fertility after cervical insemination of ewes with

- non-sorted or sex- sorted frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 22:606-612.
- Lichtenwalner A, Woods GL, Weber J.A. 1996. Seminal collection, seminal characteristics and pattern of ejaculation in llamas. *Theriogenology* 46: 293-305.
- Linfor JJ, Meyers SA. 2002. Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single cell gel electrophoresis. *J Androl* 23:107-113.
- Manjunath P, Thérien I. 2002. Role of seminal plasma phospholipids-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 58:109-119.
- Maxwell WMC, Johnson LA. 1997. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation. *Mol Reprod Dev* 46: 408- 418.
- Maxwell WMC, Evans G, Mortimer ST, Gillan L, Gellatly ES, McPhie CA. 1999. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 11:123-126.
- Maxwell WMC, de Graff SP, El-Hajj Ghaoui R, Evans G. 2007. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Society of Reproduction and Fertility supplement* 64:13-38.
- Morton KM, Vaughan JL, Maxwell WMC. 2008. Continued development of artificial insemination technology in Alpacas. Rural Industries Research and Development Corporation: Kingston, ACT.
- Morton KM, Gibb Z, Leahy T, Maxwell WMC. 2012. Effect of enzyme treatment and mechanical removal of alpaca (*Vicugna pacos*) seminal plasma on sperm functional integrity. *J Camelid Sci* 5:62-81.
- Muiño-Blanco T, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA. 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod Dom Anim* 43:18-31.
- Neild DM, Gadella BM, Chaves MG, Miragaya MH, Colenbrander B, Agüero A. 2003. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology* 59(8):1693-1705.
- Nöthling JO, Shuttleworth R, de Haas K, Thompson PN. 2005. Homologous prostatic fluid added to frozen-thawed dog spermatozoa prior to

- intravaginal insemination of bitches resulted in better fertility than albumin-free TALP. *Theriogenology* 64(4):975-991.
- O' Meara CM, Donovan A, Hanrahan JP, Duffy P, Fair S, Evans AC, Lonergan P. 2007. Resuspending ram spermatozoa in seminal plasma after cryopreservation does not improve pregnancy rate in cervically inseminated ewes. *Theriogenology* 67:1262-1268.
- Pérez LJ, Valcárcel A, de las Heras MA, Moses D, Baldassare H. 1996. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation *in vitro* as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology* 46:131-140.
- Rasul Z, Ahmad N, Anzar M. 2001. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J Androl* 22:278-283.
- Rath D, Knorr C, Taylor U. 2016. Communication requested: boar semen transport through the uterus and possible consequences for insemination. *Theriogenology* 85:94-104.
- Ratto M, Huanca W, Singh J, Adams GP. 2006. Comparison of the effect of natural mating, LH and GnRH on interval to ovulation and luteal function in llamas. *Anim Reprod Sci* 91:299-306.
- Rodríguez-Martínez H, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L, Calvete J.J. 2011. Seminal plasma proteins: what role do they play? *Am J Reprod Immunol* 66:11-22.
- Sabatini C, Mari G, Mislei B, Love C, Panzani D, Camillo F, Rota A. 2014. Effect of post-thaw addition of seminal plasma on motility, viability and chromatin integrity of cryopreserved donkey jack (*Equus asinus*) spermatozoa. *Reprod Dom Anim* 49:989-994.
- San-Martin M, Copaira M, Zuniga J, Rodriguez R, Bustinza G, Acosta L. 1968. Aspects of reproduction in the alpaca. *J Reprod Fertil* 16:395-399.
- Santiani A, Evangelista Vargas S, Valdivia Cuya M, Risopatrón González J, Sánchez Gutiérrez R. 2013. Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. *Theriogenology* 79:842-846.
- Sari LM, Zampini R, Argañaraz ME, Carretero MI, Fumuso FG, Barraza DE, Apichela SA. 2018. Expression of β -NGF and high affinity HNF receptors (TrKA) in Llama (*Lama glama*). Male reproduction tract and spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 85:934-944.

- Schjenken JE, Robertson SA. 2014. Seminal fluid and immune adaptation for pregnancy- comparative biology in mammalian species. *Reprod Dom Anim* 3:27-36.
- Stuart CC, Vaughan JL, Kershaw CM, de Graff SP, Bathgate R. 2019. Effect of diluent type, cryoprotectant concentration, storage method and freeze/thaw rates on the post-thaw quality and fertility of cryopreserved alpaca spermatozoa. *Scientific reports* 9:12826.
- Suzuki K, Asano A, Eriksson B, Niwa K, Nagai T, Rodriguez-Martinez H. 2002. Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus- oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *Androl* 25:84-93.
- Tanco VM, Ratto MH, Lazzarotto M, Adams GP. 2011. Dose- response of female llamas to ovulation-inducing factor from seminal plasma. *Biol Reprod* 85(3):452-456.
- Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlasi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L, Calvete JJ. 1998. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 30:217-224.
- Trasorras V, Giuliano S, Chaves G, Neild D, Agüero A, Carretero MI, Santa Cruz R, Baca Castex C, Alonso A, Pinto M, Morrell M, Miragaya M. 2012. *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 Dom Anim* 47:562-567.
- Trasorras V, Baca Castex C, Alonso A, Giuliano S, Santa Cruz R, 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. *Anim Reprod Sci* 148:83-89.
- Watson PF. (2000). The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60:481-492.
- Vaughan J, Galloway D, Hopkins D. 2003. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). RIRDC Rural Industries Research and Development Corporation, Pub. N° 03/104, Kingston, Australia.
- Von Baer L, Hellemann C. 1998. Variables seminales en llama (*Lama glama*). *Arch Med Vet* 30.

Zampini R, Sequeria S, Argañaraz M, Apichela SA. 2017. SL15: A seminal plasma-derived lectin from the sperm of llama (*Lama glama*). Mol Reprod Dev 9999:1-9.

Zea F, Pérez G, Maquera Z, Pacheco J. 2015. Restauración del plasma seminal en espermatozoides colectados del conducto deferente de alpaca (*Vicugna pacos*). Libro de resúmenes del VII congreso mundial en Camélidos Sudamericanos. Puno, Perú. 7: 61.

ARCHIVO SOLO PARA VISUALIZACIÓN DIGITAL

CAPÍTULO V

AVANCES DE CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN LLAMAS EN LA UNIDAD ACADÉMICA CAMPESINA DE TIAHUANACU – UNIVERSIDAD CATOLICA BOLIVIANA “SAN PABLO”

Rolando Paxipati

RESUMEN

Los camélidos sudamericanos tienen un bajo porcentaje de natalidad con la monta natural debido a varios factores, dentro de ellos el celo inducido en las llamas hembras, la alta viscosidad del semen proporcionada en las glándulas bulbouretrales del aparato reproductor del macho que no permite su fácil manipulación como sucede en otras especies, razón por la cual aún no se han perfeccionado técnicas para la criopreservación de espermatozoides en llamas, por tal motivo se tornó una situación bastante difícil de realizar la inseminación artificial (IA) con semen congelado debido a que en la evaluación microscópica disminuye la viabilidad espermática llegando a un 18 a 20% post descongelado y se limitó al uso del semen fresco en la IA de los Camélidos Sudamericanos (CSA). Con el incremento de la viabilidad espermática post descongelado, evaluando las características macro y microscópicas, elevando el porcentaje de vitalidad y motilidad espermática post descongelado, con el uso de diferentes dilutores y a diferentes tiempos de conservación y se pretende lograr la inseminación artificial de llamas.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la inseminación artificial (IA) en los CSA, está limitada al uso de semen fresco con una tasa de preñez máxima de 77%, en centros experimentales, y de no más de 50% en criaderos particulares (Huanca et al., 2007). Utilizando semen congelado de llama y alpaca se ha obtenido hasta el momento una tasa máxima de preñez del 26% (Bravo et al., 2000a; Aller et al., 2003; Vaughan et al., 2003). Los reportes sobre el efecto del congelamiento de los espermatozoides de CSA, y referentes a IA con semen congelado son exigüos. Bravo et al., (2000a) obtuvieron, en alpacas, un 26% de preñez utilizando un diluyente a base de citrato de sodio - yema de huevo y un 7% de glicerol. Aller et al., (2003), obtuvieron un 7% de preñez, en llamas, utilizando un diluyente que contenía citrato de sodio - yema de huevo - glucosa, glicerol y DMSO. Vaughan et al., (2003), obtuvieron resultados negativos luego de inseminar alpacas con semen congelado utilizando el diluyente Green/clear camel buffer® y utilizando Biladyl® A y B. En un estudio más reciente sobre los efectos del congelamiento sobre la movilidad espermática e integridad de la cromatina de espermatozoides de alpaca, Santiani et al., (2013), concluyeron que es necesario realizar más estudios sobre el efecto especie específico de los crioprotectores. Debido a las características particulares del semen, Morton et al., (2010), congelaron espermatozoides provenientes de epidídimo, para evitar la filancia del plasma seminal, con diluyentes a base de citrato, Tris o lactosa obteniendo el mayor porcentaje de movilidad y de acrosomas intactos con el diluyente a base de lactosa. Por otra parte, Maxwell et al., (2008), no obtuvieron preñeces inseminando con espermatozoides de epidídimo criopreservados. Esta situación ha conducido a que actualmente no se practiquen campañas de IA, con semen congelado de CSA, en los establecimientos que producen llamas y/o alpacas con el consiguiente atraso en el aprovechamiento de esta biotecnología.

Con respecto a los protocolos de criopreservación en los CSA, el glicerol al 7% ha sido prácticamente el único crioprotector empleado (Bravo et al., 2000a; Aller et al., 2003; Vaughan et al., 2003; Santiani et al., 2005; Morton et al., 2010). En menor medida se ha probado etilenglicol en alpacas (Santiani et al., 2005; 2013). En semen de llama, se ha observado que el agregado del crioprotector N, N-Dimetilformamida conservó la movilidad, vitalidad, integridad funcional de la membrana plasmática espermática y a su vez conservó la integridad y la condensación de la cromatina de los espermatozoides de llama. No lográndose el mismo resultado utilizando glicerol al 7%, en cuyas muestras se obtuvo muy

baja movilidad espermática y entre un 87-100% de espermatozoides con el ADN dañado según Carretero et al., (2014).

En estudios realizados en espermatozoides de alpacas obtenidos de un eyaculado, la movilidad espermática, luego de ser criopreservados, varió o disminuyó a valores que se encuentran entre el 10% a 20% (Morton et al., 2007, 2010; Santiani et al., 2005) mientras que Valdivia et al., (2000) y Bravo et al., (2000b), reportaron resultados ligeramente superiores frente a los otros autores, las diferencias pueden ser atribuidas a diferentes metodologías de criopreservación. Es interesante destacar que según Rodríguez (2009), si bien la movilidad post descongelamiento varían o bajan a un valor del 20%, los porcentajes de vitalidad pueden alcanzar un rango de 40% a 50%. Asimismo, se puede observar que el acrosoma no experimenta un daño importante durante el proceso de criopreservación (Morton et al., 2007, 2010; Santiani et al., 2005). Estos resultados indicarían que las muestras espermáticas cuando son sometidas a los diferentes procesos de criopreservación y descongelamiento, presentan bajos porcentajes de movilidad, pero no causándole la muerte al espermatozoide.

La inseminación artificial (IA) es una técnica reproductiva ampliamente utilizada en diversas especies domésticas, por la cual el semen previamente procesado es depositado por el hombre en el aparato reproductor de la hembra en el momento oportuno. Escasos trabajos de IA han sido publicados hasta el presente en camélidos sudamericanos, debido quizás a la falta de una metodología fiable de recolección de semen y a las características seminales de alta viscosidad, baja motilidad y baja concentración espermática (Fowler, 1989). Diversos métodos han sido utilizados para la recolección de semen en camélidos sudamericanos, tales como fundas vaginales (Mogrovejo, 1952), electro eyaculación (Fernández Baca y Calderón, 1966) y vagina artificial con un maniquí (Sumar, 1991). De todas las metodologías, la vagina artificial es la técnica más utilizada en el presente (Garnica et al., 1993) favorecida por la utilización de hembras naturalmente receptivas (Aller et al., 2003). A pesar que los primeros informes de IA provienen de la década del 60 (Fernández-Baca y Novoa, 1972), la técnica no ha sido suficientemente desarrollada hasta el presente como para ser utilizada a mayor escala, pero algunos ensayos con semen fresco han demostrado obtener una aceptable tasa de gestación (De la Vega y Pérez, 1996; Aller et al., 1997b; Bravo et al., 1997; 1999). Trabajos previos demostraron que la motilidad espermática varió de 10 a 30 p.100 después de la descongelación (McEvoy et al., 1994; Valdivia et al., 1999; Burgel et al., 1999). En cambio, muy poca información se encuentra disponible sobre inseminación artificial a campo con semen congelado (Bravo et al., 1996).

EXPERIENCIAS EN LA UAC - TIAHUANACU

En el laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Unidad Académica Campesina de Tiahuanacu dependiente de la Universidad Católica Boliviana "San Pablo", se encuentra en la provincia Ingavi del departamento de La Paz, a 72 km desde la sede de gobierno, entre las coordenadas 17°35' a 10°17' de latitud sur y 68°20' a 69°08' de longitud oeste, a una altura de 3854 m.s.n.m. (Diagnóstico de PDM; Municipio de Tiahuanacu, 2011), donde se viene trabajando en la criopreservación de semen en llamas, la primera experiencia fue la evaluación del efecto de tres dilutores sobre la motilidad y vitalidad espermática en la criopreservación del eyaculado de llama (*Lama glama*) bulbouretrectomizado, Departamento de La Paz. En los laboratorios de mejoramiento genético y diagnóstico clínico del servicio departamental agropecuario (SEDAG) de la prefectura del departamento de La Paz, Provincia Los Andes, se colectó eyaculado de llama bulbo uretrectomizado, intervenido quirúrgicamente en la Unidad Académica Campesina de Tiahuanacu por el método de colección directa con vagina artificial con el objetivo de evaluar el efecto de tres dilutores; (A) Tris-suero-yema-glicerina (B) PBS suero-yema-glicerina y (C) Dulbecco –suero-yema –glicerina, en proporciones de 64-15-15-6% (N1), 54-20-20-6 % (N2) y 44-35-15-6% (N3), sobre la motilidad y vitalidad de las células espermáticas en el proceso de crioconservación. Para A, B y C los dilutores fueron adicionados, en una primera etapa, sin glicerina a 30°C y refrigerándose lentamente hasta conseguir los 4°C donde se adicionó la segunda fracción con glicerina en intervalos de 15 min. Para empajillar, sellar y llevarlos a vapores de nitrógeno líquido y sumergirlos (Decuadro-Hansen, 1997). La evaluación de la motilidad y vitalidad espermática se realizó en la etapa de colección, al final de la refrigeración, al final de la congelación y a la segunda semana después de la congelación. Los resultados promedio de motilidad y vitalidad para efecto dilutor fueron 29.85% y 34.82% para dilutor Dulbecco superior ($P < 0.05$) a los dilutores Tris y PBS. Los niveles protocolares 1 y 2 fueron superiores ($P > 0.05$) al nivel 3, con porcentaje de 26.71%; 27.07% y 31.17%; 30.94% para motilidad y vitalidad respectivamente. El efecto del proceso de crioconservación disminuyó notablemente la motilidad y vitalidad espermática, los que respectivamente, descendieron de una etapa de colecta con 64.00 y 73.00 % llegando a la refrigeración con 53.79 y 62.54 %, descendiendo aún más al descongelado con 12.86 y 15.02 % y a las 2 semanas de haber congelado llegó a obtenerse 12.03 y 13.79%. Posiblemente se deba a los efectos del proceso de crioconservación, los repercutieron negativamente sobre la estructura y función de la membrana, aparato motor y núcleo del

espermatozoide, haciendo una ecuación biofísica compleja en el que interviene la calidad de dilutor, crioprotector, tiempos y temperaturas de exposición, para determinar el punto de éxito en la crioconservación de espermatozoides (Gonzales, 2004)

En la actualidad en otra experiencia se realizó la **EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN EN LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMEN DE LLAMA (*Lama glama* L.) OBTENIDOS POR ASPIRACIÓN VAGINAL**

La congelación de semen es una biotecnología reproductiva muy poco empleada en camélidos sudamericanos (CSA). Las dificultades en la colección de semen es a causa de la alta viscosidad, y el escaso conocimiento sobre dilutores apropiados para el semen de CSA se constituyen en los principales factores que imposibilitan el desarrollo de protocolos de criopreservación. Se evaluaron dos protocolos de criopreservación (pajuelas y pellets) y dos dilutores comerciales (AndroMed y Triladyl). Se seleccionaron 3 llamas Q'ara machos de 4 años de edad. Para la colección de semen se seleccionó 9 hembras sexualmente receptivas, la colección de semen se realizó mediante el método de aspiración vaginal post – cópula, en las muestras obtenidas se evaluaron las características macro-microscópicas del semen. Las muestras fueron diluidas con AndroMed y Triladyl independientemente, refrigeradas desde 38 a 5°C en 2 horas. Para la congelación en pajuelas y pellets, la curva de congelación gradual fue de 3; 3; 3 y 1 cm por 5; 5; 5 y 2 min hasta sumergirla en nitrógeno líquido partiendo de 10 cm por lapso de 17 min total; se evaluó la motilidad y vitalidad espermática en las muestras descongeladas. El ensayo se enmarca en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x2. La motilidad post descongelación para el método de vapores de nitrógeno en pajillas fue de 41.17±15.46 y 43.24±14.61 % para AndroMed y Triladyl respectivamente, y para el método en pellets presentó 19.17±13.23 y 28.19±15.49 % para AndroMed y Triladyl, con diferencia entre métodos ($P<0.01$); la vitalidad en el método de pajillas tuvo un promedio de 49.24±14.83 y 53.01±11.66 % para AndroMed y Triladyl, y para el método de pellets presentó 28.60±10.89 y 42.68±13.38 % para AndroMed y Triladyl de vitalidad espermática, existiendo diferencia significativa ($P<0.01$) entre métodos. El método de congelación a vapor de nitrógeno en pajillas, mostró resultados óptimos de calidad espermática post descongelamiento de semen de llamas (Choque, 2019).

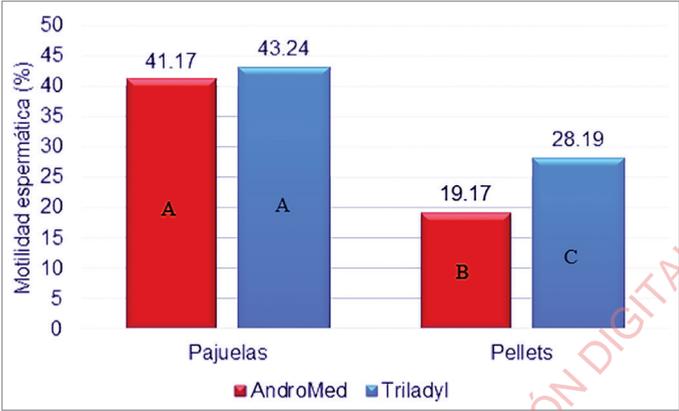


Figura 1. Comparación de protocolos de criopreservación por diluyente y tipo de envasado de pajillas en la motilidad espermática de semen de llama

En la figura 5, muestra la comparación de medias Duncan para los factores de interacción dilutores (AndroMed y Triladyl) y protocolos de criopreservación en la motilidad espermática crio preservadas a -196°C descongelando a una T° de 38°C , mostrando promedios de motilidad para método de criopreservación pajuelas 41.17 y 43.24 % para dilutores AndroMed y Triladyl, para método de criopreservación pellets 19.17 y 28.19 % de motilidad para AndroMed y Triladyl. En la tabla también se observa que entre protocolos de criopreservación muestran diferencias entre letras en los dilutores A y A para pajuelas; B y C para pellets posiblemente se debe a la velocidad de congelamiento que se empleó en cada método o al volumen de las muestras criopreservadas.

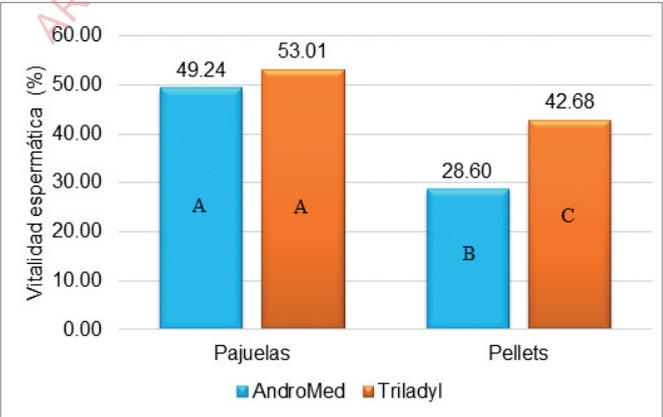


Figura 2. Efectos simples para protocolos de criopreservación por diluyente y tipo de envasado de pajillas en la motilidad espermática de semen de llama

En la figura 2, Muestra la comparación de medias Duncan para los factores de interacción dilutor y métodos de crio preservación en la vitalidad espermática criopreservadas a -196°C descongelando a una T° de 38°C , mostrando promedios de vitalidad espermática para dilutores comerciales AndroMed 49.24 y 28.6 % para métodos criopreservación pajuelas y pellets, para dilutor comercial Triladyl 53.008 y 42.68 % de vitalidad para métodos criopreservación Pajuelas y Pellets. Se puede apreciar en la figura 8, que entre dilutores AndroMed y Triladyl no existe diferencia entre letras estadísticas A y A en pajuelas, sin embargo para protocolos de pellets si existe diferencias entre letras estadísticas B y C para dilutores.



Figura 3. Proceso de colección de semen de llama post coital

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aller JF, Rebuffi GE, Cancino AK, Alberio RH. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). Arch Zootec. 52: 15-23.
- Aller, J. F., Rebuffi, G. E., Cancino, A. K., y Alberio, R. H. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). Arch. Zootec. 52, 15-23.
- Bravo, P. W., Ccallo, M., y Garnica, J. 2000. The effect of enzymes on semen viscosity in llamas and alpacas. Small Rumin. Res. 38, 91-95.
- Carretero, M. I., Neild, D. M., Ferrante, A., Caldevilla, M., Arraztoa, C. C., Fumuso F. G., Giuliano, S. M. 2014. Effect of cryoprotectant and equilibration

- temperature on cryopreservation of Lama glama spermatozoa. *Andrologia*, doi: 10.1111/and.12319.
- Fernández Baca, S., Novoa, C., Sumar, L. 1972. Comportamiento sexual de la alpaca macho frente a la renovación de las hembras. *Rev Inv Pec. IVITA* 1(2):115-128.
- Fernández Baca, S., y Calderón, W. 1966. Methods of collection of semen in the alpaca. *Revista de la FMV, UNMSM* 13, 18 – 20.
- Fowler, M. 1998. *Medicine and Surgery of South American Camelids*. Second Edition. Iowa State University Press/Amer, 391.
- Huanca, W., Cordero, A., Huanca, T., y Adams, G. P. 2007. Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos: avances y perspectivas. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 15(1), 195-201.
- Maxwel, C., Evans, G., Morton, K. 2008. The development of collection, processing and Storage Technologies for Alpaca Semen, Extender abstracts WBC/ICAR Satellite Meeting on.
- McEvoy TG, Bourke DA, Adam CL. 1994. Recent advances in understanding and controlling the reproductive biology of South American camelids. En: *Reproductive Technology and andrology meeting*. España 5: 277-298.
- Mogrovejo D. 1952. Estudios del semen de alpacas. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 21 p.
- Morton, K. M., Roslyn Bathgate, A. B., Evans, G., Maxwell, W. M. 2007. Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate-Tris and Lactose-Based diluents and pellets and straws. *Reproduction, Fertility and Development*; 19 (7), 792-796.
- Morton, KM; Gibb, Z; Bertoldo, M; Maxwell, WM. 2010. Effect of diluent, dilution rate and storage temperature on longevity and functional integrity of liquid stored alpaca (*Vicugna pacos*) semen. *Journal of Camelid Science* 2:15-25.
- Rodríguez, C. 2009. Efecto del plasma seminal sobre la supervivencia de espermatozoides criopreservados de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis Mag. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, Univ Nacional Mayor de San Marcos. 72 p.
- Santiani, A., Evangelista, S., Valdivia, M., Risopatrón, J., Sanchez, R. 2013. Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and

- Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. *Theriogenology*, 79: 842-846.
- Sumar, J. 1991. Fisiología de la reproducción del macho y manejo reproductivo. En: Avances y Perspectivas del Conocimiento de los Camélidos Sudamericanos. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Chile. Págs. 111-120.
- Valdivia, M., Suyo, M., Manosalva, I., Ruiz, M., Romero, S., Olazabal, J. 2000. Cryopreservation and immunoreactivity of proacrosin/acrosin system in alpaca spermatozoa. *Biol Reprod* 62 (Suppl): 146-157.
- Vaughan, J. L., Galloway, D., Hopkins, D. 2003. Artificial insemination in alpacas (*Lama glama*). Australia, RIRDC, Project AAA-1A.

ARCHIVO SOLO PARA VISUALIZACIÓN DIGITAL

CAPÍTULO VI

LA TRANSFERENCIA EMBRIONARIA EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Henry William Vivanco Mackie

RESUMEN

La producción y transferencia de embriones es un área de gran interés para el mejoramiento genético y la optimización de la reproducción en camélidos sudamericanos (CAS). Este capítulo trata sobre los procesos de producción embrionaria IN VIVO y su transferencia a receptoras para la obtención de crías. Se revisan aspectos fisiológicos que son de relevancia para la generación de tecnologías de manejo del ciclo ovárico, la superovulación, obtención de los embriones y su transferencia; se fundamentan y describen las tecnologías utilizadas y los resultados de su aplicación.

En los primeros ensayos de superovulación en alpacas (Novoa y Sumar, 1968; Correa et al., 1992, 1994; Novoa et al., 1999) se usaron diversas estrategias superovulatorias con resultados muy variables en términos del número de embriones transferibles por donante sometida a tratamiento superovulatorio, sin lograr que esta tecnología sea aplicable comercialmente pero después de varios años de trabajo en el desarrollo de regímenes superovulatorios, métodos de colección y transferencia embrionaria, tenemos hoy en día una tecnología repetible y comercialmente eficiente para la producción y transferencia embrionaria in vivo en alpacas y llamas (Vivanco H.W. et al., 2009; Vivanco H.W., 2013; Vivanco W., et al. 2014; 2015; 2015a; Carnero S. et al., 2011; Huanca T, et al., 2012; Huanca T. et al, 2014; Pineda et al; 2012; Sumar et al.; 2012) con un promedio de 4 embriones transferibles por alpaca por ronda de superovulación y 40% de nacimientos para embriones frescos, esta tecnología puede extrapolarse a especies de CAS silvestres. Se abarca también la tecnología de producción embrionaria sin superovulación, las técnicas de lavaje uterino y de transferencia embrionaria, las características de los embriones y su sobrevivencia hasta el nacimiento.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de tecnologías reproductivas para alpacas y camélidos sudamericanos en general ha sido muy lento y discontinuo, sin embargo en los últimos 10 años se ha visto un mayor avance tecnológico y una activa participación de varios grupos científicos tanto a nivel nacional (Perú), sudamericano y mundial. Una de las tecnologías reproductivas que más avance ha demostrado en los años recientes y que es una tecnología de gran impacto potencial en el mejoramiento genético y en la conservación y/o rescate de especies y líneas genéticas de camélidos sudamericanos es la transferencia embrionaria.

Se conoce como Transferencia Embrionaria al conjunto de tecnologías que permiten la producción de embriones de una hembra determinada (madre genética o donante) y su transferencia a otra hembra o hembras (madres nodrizas o recipientes) para su gestación, parición y crianza hasta el destete.

La tecnología de Transferencia Embrionaria tiene el objetivo de permitir la maximización de la tasa reproductiva de las hembras (incrementar el número de crías producidas por unidad de tiempo por hembra donante selecta) aprovechando la disponibilidad del gran número de ovocitos existentes en los ovarios. En los camélidos sudamericanos se tiene la ventaja adicional de que la tecnología de transferencia embrionaria permite la reproducción de animales puros de una especie usando para la gestación de sus embriones animales de otra especie (transferencia ínter especies) lo cual podría permitir el rescate y multiplicación de especies silvestres como vicuñas y guanacos gestados en llamas o alpacas; así P.J. Taylor et al. (2001) transfiriendo embriones de alpacas puras a llamas produjo crías alpaca puras y normales que fueron aceptadas por las nodrizas y por el rebaño de llamas al cual pertenecieron las recipientes; ese experimento fue también validado por nosotros (Vivanco et al., 2014) así como por otros grupos de investigadores en el Perú (Sumar et al., 2012; Huanca et al., 2012; Pacheco et al., 2016).

La producción y transferencia de embriones IN VIVO es hoy en día la tecnología reproductiva más eficaz para el incremento de la tasa reproductiva tanto de hembras como de machos ya que su estado de desarrollo tecnológico permite su aplicación comercial en el mejoramiento genético en forma costo efectiva.

En este capítulo se muestran además los logros obtenidos hasta la fecha en las diferentes áreas de la tecnología y las potencialidades para su desarrollo futuro.

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EMBRIONARIA

La tecnología de Transferencia Embrionaria puede utilizar para la producción de los embriones sistemas IN VIVO (es decir dentro de la propia madre genética) así como sistemas IN VITRO (es decir en laboratorio, fuera del cuerpo de la madre genética).

La producción de embriones IN VIVO

La producción de embriones IN VIVO requiere que las madres genéticas (conocidas como “donantes” de los embriones) tengan actividad reproductiva normal, siendo capaces de desarrollar los folículos ováricos hasta su estadio preovulatorio, ovular los folículos maduros liberando los ovocitos, capturar y fertilizar los ovocitos en el oviducto y desarrollar normalmente los embriones en oviducto y en el útero hasta el estadio adecuado para su transferencia. Esto supone que las donantes tienen que ser animales post puberales y óptimamente, hembras sexualmente maduras y reproductivamente normales.

En la mayoría de las especies de explotación zootécnica de ovulación espontánea, excepto en equinos, se utilizan hormonas gonadotrópicas para la estimulación del desarrollo simultáneo de varios folículos de tal manera que se produzcan varias (múltiples) ovulaciones al mismo tiempo (ver W. Vivanco, 2000); en equinos, a pesar de que muestran una respuesta adecuada a la estimulación gonadotrópica para “Ovulación Múltiple” hay fallas en la captura por la fimbria de los ovocitos ovulados por lo que por lo general se colectan los embriones sin estimulación hormonal del ovario sino producidos naturalmente en cada ciclo estral en que se haya producido fertilización. Tenemos entonces dos escenarios dentro de la producción de embriones IN VIVO:

- Ovulación múltiple inducida hormonalmente (o superovulación, conocido internacionalmente como MOET por su abreviación de “Multiple Ovulation and Embryo Transfer”)

- Ovulación natural (sin estimulación hormonal del ovario) que normalmente, excepto en porcinos que tienen ovulación múltiple natural, produce una o dos ovulaciones por vez.

Las etapas que involucra la producción de embriones IN VIVO son:

- La selección y preparación de donantes y recipientes y si las transferencias se efectuarán en fresco, será necesaria la sincronización de la ovulación de las donantes con las recipientes.
- La estimulación ovárica de las donantes para desarrollo folicular múltiple (si se trabaja con superovulación) y para lograr ovulación eficiente.
- El servicio a la donante para lograr la fertilización de los ovocitos ovulados.
- El lavaje uterino de la donante para obtener los embriones
- La selección y transferencia de los embriones (de la calidad y estado de desarrollo adecuado) a las recipientes que muestren cuerpo lúteo funcional y cuya ovulación se ha sincronizado con la donante y/o cuyo intervalo desde la ovulación a la transferencia es adecuado para el estadio de desarrollo del embrión transferido.

La producción de embriones IN VITRO

La producción de embriones IN VITRO consiste en la cosecha de ovocitos de los folículos ováricos, su maduración llevándolos a estadio de Metafase II bajo condiciones de laboratorio; paralelamente capacitar los espermatozoides en laboratorio y fertilizar los ovocitos madurados para luego una vez fertilizados cultivarlos en laboratorio hasta su estadio adecuado para transferencia (ver W. Vivanco, 2000, 2004, 2005, 2006). La tecnología IN VITRO nos permite coleccionar material genético además del de donantes sexualmente maduras y reproductivamente funcionales, de donantes de edades imposibles de trabajar bajo sistema IN VIVO (donantes en estadio fetal, pre-púberes tan jóvenes como 2 meses de edad; animales púberes y animales viejos y seniles) y de diferentes condiciones fisiológicas (lactantes, vacías, preñadas, ciclando normalmente, en anestro, hembras con problemas reproductivos, etc.) y aún de animales muertos (recolección de ovocitos de ovarios de matadero).

La producción de embriones IN VITRO es materia de otros capítulos de este libro; en este capítulo nos centraremos en la producción de embriones IN VIVO.

ASPECTOS FUNDAMENTALES DE LA FISIOLÓGÍA OVÁRICA DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS QUE SON RELEVANTES PARA EL DESARROLLO DE LAS TECNOLOGÍAS DE PRODUCCIÓN Y TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

Las alpacas y camélidos en general son animales de ovulación inducida, las hembras ovulan sólo en respuesta a un estímulo y sólo si al tiempo de aplicación del estímulo el folículo ovárico está en el adecuado estado de desarrollo (Bravo et al., 1991). El estímulo puede ser la simple presencia del macho (Vivanco et al., 1985), la misma cópula y su duración (Vivanco et al., 1985; Sumar, 1985), la inducción de la ovulación mediante la aplicación exógena de hormonas gonadotropas (Rodríguez, 1959; England et al., 1969; Leyva et al., 1977; Bravo et al., 1997; 2000) o la inducción mediante “factores ovulatorios” presentes en el plasma seminal (Adams et al., 2005; Ratto et al., 2006b). Las alpacas ovulan luego de 30 horas de la inducción si al momento de la inducción tienen un folículo de por lo menos 6 mm de diámetro (Adams G.P. y Ratto. M.H., 2001; Bravo et al., 1991), el cuerpo lúteo se forma 2 a 3 días después de la inducción por cópula y regresiona 11 a 12 días después de la cópula si no ocurrió la concepción (Adams et al. 1989). Las alpacas no expresan “ciclo estral” (intervalo entre dos celos espontáneos), sino que presentan “ondas foliculares” de desarrollo y regresión de los folículos ováricos (Adams et al. 1990; Bravo et al. 1990; Vaughan et al. 2004). Los folículos ováricos en las alpacas (en hembras que no han sido expuestas a machos) muestran desde su comienzo en la pubertad ondas continuas de desarrollo y regresión que se superponen en ciertos segmentos de la onda, hay un segmento de la onda en el que están emergiendo y desarrollando nuevos folículos y al mismo tiempo están regresionando los folículos viejos. La onda folicular puede ser dividida en tres fases: una primera fase de emergencia y desarrollo inicial, otra fase de franco desarrollo y maduración y una tercera fase de regresión. La fase de desarrollo inicial se superpone con la fase de regresión de la onda folicular previa (Bravo et al.1990).

En las alpacas el desarrollo folicular desde su estado inicial de 2 a 3 mm de diámetro hasta su estado de desarrollo de 8mm de diámetro toma en promedio 4.8 días, luego la maduración y desarrollo hasta 12 mm toma 5 días más y a partir de ese momento el folículo maduro empieza a regresionar (si no ha habido estímulo ovulatorio) tomando la regresión 4 días; el desarrollo de una nueva onda folicular empieza 2 o 3 días luego de la iniciación de la regresión del folículo dominante de la onda anterior consecuentemente el intervalo entre ondas foliculares en la alpaca es de 11 a 12 días (Bravo et al. 1990; Adams et al. 1990)

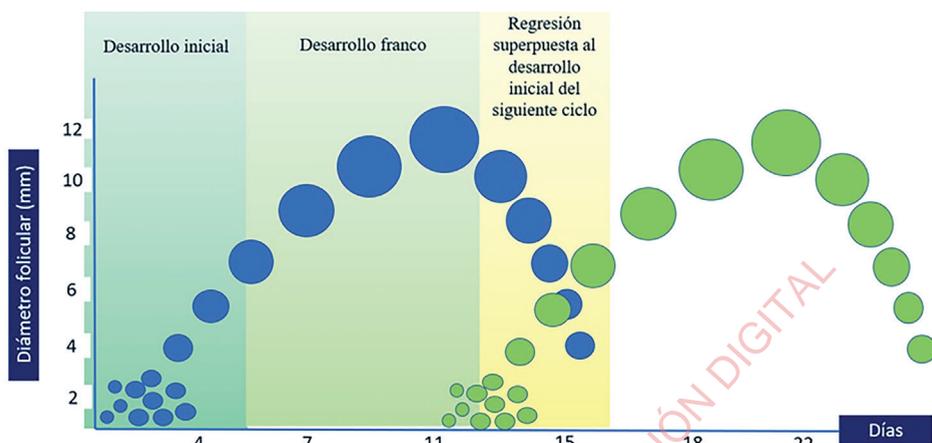


Gráfico 1. Esquema de los ciclos ováricos en la alpaca.

El desarrollo de las ondas foliculares es alternado entre los ovarios en el 81% de los casos (Bravo et al., 1990); existen obviamente variaciones individuales, por ejemplo Vaughan et al. (2004) encontraron que el 39% de las alpacas muestra intervalos de onda folicular de 12 días pero el 32% presenta ondas de 16 días existiendo una correlación directa entre la longitud del intervalo entre ondas y el tamaño máximo del folículo maduro. Al inicio de la onda folicular hay varios folículos desarrollando simultáneamente pero solo uno de ellos desarrollará como folículo dominante estableciéndose una relación inversa entre el diámetro del folículo dominante y el número de folículos acompañantes. Observaciones de Vaughan et al. (2004) muestran que la tasa de desarrollo del folículo dominante es consistente para todas las ondas y que llega a su tamaño preovulatorio a los 10 días de la emergencia de la onda folicular independientemente del subsecuente intervalo entre ondas foliculares, consecuentemente podemos nosotros predecir el tiempo óptimo para la cópula si tenemos control sobre el momento de emergencia de la onda folicular.

Adams et al. (1990) describen para llamas no servidas y servidas pero no preñadas un intervalo de emergencia de folículos dominantes sucesivos de 19.8 días, mientras que en llamas preñadas este intervalo se reduce a 14.8 días. Otro factor que los mismos autores encuentran que reduce el intervalo de emergencia de folículos dominantes en llamas es la lactación, que reduce el intervalo en 2 días así como causa también una reducción en el diámetro máximo del folículo dominante, que en llamas no preñadas es de 9 a 16 mm, siendo menor en las

preñadas. En llamas que ovularon pero que no preñaron después de la cópula con ovulación, el cuerpo lúteo se mantiene por 10 días y cuando el cuerpo lúteo está presente hay menor cantidad de folículos y son de tamaño más reducido.

Miragaya et al. (2006), describen las ondas foliculares para la vicuña, la duración promedio de la onda folicular fue de 7 días con un rango de 4 a 11 días. La fase de desarrollo folicular fue de 3 días, desarrollándose el folículo a un promedio de 1.8 mm por día, la fase estática del folículo dominante fue de sólo 1.5 días y la fase de regresión de 3 días; el diámetro máximo promedio del folículo dominante fue de 8.4 mm y el máximo tamaño del folículo subordinado fue de 5 mm. Estos autores encontraron para la vicuña una relación inversa entre el tamaño total del folículo dominante y el número de folículos acompañantes que es el mismo efecto descrito por Vaughan et al. (2004) en alpacas.

EL CONTROL DEL CICLO OVÁRICO EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Para controlar la onda folicular es necesario conocer el estadio de ésta, una forma de hacerlo es haciendo un seguimiento de la onda por examinación ultrasonográfica por lo menos por 14 días para poder detectar el momento de emergencia de la onda folicular. Otra forma es induciendo ovulación y una vez que el cuerpo lúteo (CL) es funcional (3 a 5 días post cópula o 2 a 3 días post ovulación), se induce la regresión del CL inyectando PgF2 α (Fernandez Baca 1971; Gamarra, et al., 2007). Otros han tratado de controlar el ciclo ovárico induciendo una fase luteal artificial mediante tratamiento con progestágenos e iniciando una nueva fase folicular 5 a 7 días después de la finalización de la fase luteal inducida (Alberio y Aller., 1966; Chaves et al., 2002). Ratto et al., (2003), informan sobre control del ciclo ovárico en camélidos por ablación del folículo dominante ya sea por método hormonal o por medio mecánico.

En base a las observaciones de Vaughan et al. (2004) sabemos que podemos esperar un folículo pre ovulatorio maduro y al máximo desarrollo folicular 10 días después de iniciada la onda folicular, por lo que podemos hipotetizar que si controlamos la iniciación de la onda y estimulamos el ovario con gonadotropinas para lograr el máximo desarrollo de múltiples folículos y los acompañamos desde el inicio de la onda hasta el estadio preovulatorio 10 días luego de la iniciación de la onda entonces podremos obtener superovulación.

Cuando se hace estimulación ovárica para ovulación múltiple en alpacas debemos de tomar en cuenta que los folículos producen suficiente cantidad de estrógeno para estimular la secreción de niveles ovulatorios de LH luego de la cópula o estímulo ovulatorio hormonal sólo cuando los folículos pre ovulatorios tienen de 6 a 12 mm de diámetro, entonces ocurre la ovulación con la subsecuente formación de un CL funcional; pero cuando los folículos son menores de 6mm (4-5 mm) son muy pequeños aún y no producen suficiente estrógeno para estimular la producción endógena de LH en respuesta a una estimulación ovulatoria y fallan en ovular. En el otro extremo si los folículos son muy viejos y ya han iniciado el proceso de regresión luego de llegar a su máximo desarrollo, aun cuando en estos casos hay suficiente producción de LH endógeno, las hembras no ovulan, los folículos se luteinizan y los CL que se forman no son normales y tienen una corta vida media de aproximadamente 5 días (Bravo et al., 1991). Es pues extremadamente importante supervisar el desarrollo folicular durante la estimulación superovulatoria de tal manera que la cópula o inducción ovulatoria hormonal se haga en el momento adecuado, no antes, no después. Bravo et al. (1991), también demostraron que las llamas producen niveles más altos de LH que las alpacas en los diferentes estadios del desarrollo folicular; esto podría explicar los mejores resultados que se obtienen en llamas en su respuesta a regímenes superovulatorios en comparación a las alpacas.

Se puede concluir que la clave para obtener una adecuada respuesta a la estimulación hormonal ovárica para superovulación en alpacas es la habilidad de controlar la iniciación de la onda folicular y manejar el tiempo de inducción de la ovulación en tal forma que sea hecha al momento óptimo del desarrollo folicular de tal manera que se consiga la adecuada respuesta a los niveles de LH endógeno o exógeno. Los niveles de FSH usados son menos críticos y pueden ser optimizados por titulación de acuerdo a la respuesta, sin embargo se debe tomar en cuenta que existe una variación individual grande en la respuesta a un determinado nivel de FSH (Bravo et al. 1990).

DIFERENTES REGÍMENES O ESTRATEGIAS DE SUPEROVULACIÓN ENSAYADOS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

La mayoría de los trabajos en superovulación de camélidos sudamericanos (CAS) se han hecho en llamas, comparativamente muy pocos en alpacas, sin embargo la aplicación de MOET en mejora genética es mayormente hecha en

alpacas debido a su importancia en producción de fibra en la región alto andina y el alto valor de los individuos de esta especie en países fuera de la región andina donde han sido introducidos hace más de 3 décadas.

En los primeros ensayos de superovulación en alpacas (Novoa y Sumar, 1968; Correa et al., 1992, 1994; Novoa et al., 1999) se usaron diversas estrategias superovulatorias con resultados muy variables en términos del número de embriones transferibles por donante sometida a tratamiento superovulatorio. Las estrategias iniciales trataron de imitar o extrapolar los protocolos de superovulación de ovinos inyectando FSH durante una fase luteal artificial, así, Correa et al. (1992) usaron una fase progestacional artificial de 12 días, 4 alpacas fueron tratadas con FSH 3 días antes de la finalización de la fase progestacional y 4 alpacas con eCG inyectada al final del tratamiento progestacional que resultó en un promedio de 2.5 CL y 1.1 embriones transferibles por donante tratada. En cambio Novoa et al. (1999) no usaron una fase progestacional, ellos seleccionaron por ecosonografía alpacas con folículos de menos de 7 mm de diámetro a las que inyectaron 500 a 750 i.u. eCG el día cero y hCG (700 a 1000 i.u.) el día de la cópula (día 5), el promedio de embriones transferibles fue de 1.7 por alpaca tratada.

Los primeros trabajos de nuestro grupo (Gamarra et al., 2007) para desarrollar tratamientos superovulatorios para alpacas, ensayaron diferentes estrategias, ensayamos tratamientos con inyección de FSH 3 días antes de la finalización de una fase luteal inducida de 9 días y tratamientos sin fase progestacional y sin saber el estado de desarrollo del folículo al inicio de las inyecciones de FSH que se aplicaron por 5 a 7 días después de una inyección de prostaglandina y se continuaron por 3 días hasta la cópula; los tratamientos de FSH al final de una fase progestacional no difirieron en el número de embriones transferibles a los obtenidos por tratamientos con FSH sin fase progestacional; la tasa de ovulación obtenida con ambas estrategias fue baja probablemente debido a presencia del folículo dominante al inicio de las inyecciones de FSH lo que no se pudo comprobar ya que no hicimos seguimiento ultrasonográfico de la emergencia de la onda folicular ni de la presencia de folículo dominante. Miragaya et al. (2006), informan que la presencia de folículo dominante de 5 mm o más al momento de aplicación de la gonadotropina, induce el desarrollo solo del folículo dominante y no el de sus acompañantes.

La inyección de gonadotropinas en CAS dentro de una fase luteal natural o artificial, o sea cuando está actuando la progesterona, según varios autores

(Bourke et al., 1992, 1995; Aller et al., 2002a) resulta en pobre respuesta superovulatoria. Adams et al. (1990) demostraron que cuando hay un CL presente hay menos folículos y son de menor tamaño y por lo tanto habría una clara limitación al desarrollo folicular en CAS en presencia de progesterona, esto ha sido corroborado por Chávez et al. (2002) quienes demostraron que la inyección de progesterona exógena en cualquier estado del ciclo ovárico en CAS inhibe el desarrollo folicular; este efecto sería independiente de la presencia y funcionalidad del folículo dominante, así tratamientos con gonadotropinas cuando está actuando la progesterona acompañada con una inyección de Benzoato de Estradiol para limitar el desarrollo del folículo dominante resultó también en pobre respuesta superovulatoria en llamas (Aller et al., 2002). Nuestras observaciones (Vivanco et al., 2009) sólo parcialmente estarían de acuerdo con las observaciones de Aller, nosotros hemos encontrado que si la gonadotropina es inyectada dentro de la fase progestacional pero cerca al final de la misma (últimos 3 días) la producción de embriones transferibles es baja, pero si la gonadotropina es inyectada al inicio de la fase luteal cuando una nueva onda folicular está emergiendo luego de la ovulación, la respuesta superovulatoria es satisfactoria. En nuestros ensayos comparando diferentes estrategias para controlar el inicio de la onda folicular (Vivanco et al., 2009), seleccionamos por ecosonografía alpacas que tenían folículos de 8 mm o más y se les indujo a ovular por cópula con machos vasectomizados más una inyección de GnRH inmediatamente después de la cópula (día cero), las alpacas ovularon y formaron CL funcionales y recibieron 1,000 i.u. de eCG el día 2 luego de la cópula; el día 7 fueron inyectadas con PGF2 α y el día 8 fueron servidas por monta natural dos veces con machos enteros fértiles e inyectadas con hCG; los embriones fueron colectados el día 15 después de la cópula (ver cuadro 1).

La aplicación de este protocolo produjo una onda folicular que emergió después de la ovulación inducida en el día cero y fue estimulada para su desarrollo con la inyección de eCG el día 2 coincidiendo con el momento en que formaban su CL funcional, los folículos por lo tanto desarrollaron durante la fase progestacional temprana; las donantes tuvieron en promedio 6.0 cuerpos lúteos por alpaca y el número promedio de embriones transferibles por donante fue 2.77, estos resultados fueron superiores a los de los grupos que reportaron que el tratamiento con gonadotropinas se aplicó en la parte final de la fase progestacional y a los grupos que fueron tratados con gonadotropinas después que finalizó la fase progestacional. Nosotros hemos ajustado la dosis de eCG y actualmente estamos usando entre 600 y 700 UI de eCG, para evitar la presencia de folículos al momento de la colecta, porque hemos notado que la presencia de folículos al

momento de la colecta tiene relación inversa con la recuperación de embriones. La dosis de 600 UI de eCG en llamas, produjo 3 embriones en promedio, sin la presencia de folículos y 6.8 CLs en promedio.

Cuadro 1. Régimen superovulatorio de Vivanco International SAC para alpacas

Día	TRATAMIENTO A LAS DONANTES	TRATAMIENTO A LAS RECIPIENTES
DIA CERO 0	Selección de alpacas con folículos de 8 mm de diámetro o más. Inyección de GnRH (0.0084 mg de acetato de Buserelina) , cópula con machos vasectomizados (PM)	
Día 2	Inyección de 600 a 700 u.i de eCG (AM)	
Día 7	Inyección de PGF2 α (0.25 mg. de Cloprostenol) (AM)	
Día 8	Verificación de número y tamaño de folículos de 8mm a más, Primera cópula con macho entero fértil ; aplicación de 0.0084 mg de acetato de Buserelina (AM)	
	Segunda cópula con macho entero fértil (PM)	Aplicación de GnRH (0.0042 mg. of Buserelin acetate) + cópula con macho vasectomizado a las alpacas receptoras a macho (PM)
Día 14	COLECCIÓN DE EMBRIONES (AM)	TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (a partir de medio día)

Fuente: Vivanco et al, 2009; Vivanco W. 2013

Repeticiones de nuestro protocolo exitoso del cuadro 1 nos han dado resultados muy satisfactorios llegando hasta 4.18 embriones colectados por alpaca donante (cuadro 2).

Vaughan, (2012) informa que ha tratado 1,600 donantes para superovulación y que las donantes han sido inducidas a ovular y formar CL con una inyección de Buserelina recibiendo luego tratamientos superovulatorios (no revela el régimen mismo de superovulación) y señala que obtuvo un promedio de 6.6 ovulaciones y 2.6 embriones colectados por donante, siendo estos promedios similares a los reportados por nosotros (Vivanco W. 2013).

Cuadro 2. Respuestas superovulatorias de alpacas tratadas con el régimen superovulatorio de Vivanco International con eCG a la iniciación de la onda folicular y en presencia de un CL funcional.

Ensayo/Año	N° de donantes	Total CL/ donante promedio \pm SD	Total embriones colectados/ donante Promedio \pm SD	Blástulas transferibles colectadas/ donante Promedio \pm SD
I, 2012	26	6.00 \pm 2.01	2.50 \pm 2.28	1.50 \pm 2.00
II, 2013	17	6.88 \pm 2.15	4.18 \pm 5.11	3.80 \pm 4.87
III, 2013	20	6.81 \pm 3.22	3.69 \pm 3.42	3.13 \pm 3.24

Data: Vivanco W. 2013

Se debe tomar en cuenta que para superovulación no es suficiente tener varios folículos desarrollándose, es de igual importancia lograr que todos los folículos en desarrollo maduren y ovulen y que se obtenga una alta tasa de fertilización de los ovocitos ovulados. Sabemos que en llamas y alpacas Bravo et al. (1991) si inducimos ovulación cuando los folículos son de menos de 4 mm de diámetro no habrá secreción de LH y consecuentemente no habrá ovulación y por otro lado si los folículos maduros comienzan a regresionar aun cuando haya suficiente nivel de LH no habrá ovulación sino luteinización de folículos. Por lo tanto es crítico inducir la ovulación al momento preciso o sea cuando el folículo está maduro y tiene entre 8 y 12 mm de diámetro. Aller et al. (2003) recomiendan estimular la ovulación cuando el folículo tiene 7 mm; para lograr la estimulación al momento oportuno es necesario hacer un seguimiento del desarrollo folicular durante el período de desarrollo inducido por las gonadotropinas e inducir la ovulación por cópula y/o inyección de hCG o GnRH cuando el folículo tiene más de 7 mm de diámetro (Vivanco et al., 2009).

Ratto et al. (1997) informan que en llamas la cópula después de 36 horas desde la última inyección de FSH en animales que recibieron tratamiento de

gonadotropinas por 5 días, incrementó la respuesta ovulatoria en comparación con llamas que recibieron la estimulación por cópula inmediatamente al final del tratamiento con gonadotropinas por 5 días; el hecho de que las llamas no recibieron tratamiento de gonadotropinas por 36 horas desde el final del tratamiento con gonadotropinas hasta la cópula hace muy difícil de interpretar la data ya que hay efectos confundidos, la pregunta sin resolver es que respuesta hubiera habido si en lugar de suspender el tratamiento por 36 horas hubiera continuado.

Muchos autores, incluidos nosotros, informan de dos cópulas en donantes CAS tratadas para superovulación, sirviendo nuevamente a las donantes a las 12 o 24 horas desde la primera cópula (Aller et al. 2002b; Ratto et al. 1997; Gamarra et al., 2007; Vivanco et al., 2009), esto se hace con el objeto de incrementar la disponibilidad total de espermatozoides móviles para la fertilización de los muchos ovocitos producidos en la superovulación y no tiene influencia en la tasa de ovulación ya que tanto en alpacas como en llamas la pituitaria no responde a la segunda cópula o inyección de GnRH secretando más LH si la cópula o inducción se hace dentro de las 24 horas desde la primera como fue demostrado por Bravo et al (1992).

Hay informes conflictivos acerca de la superioridad en respuestas cuando se usa FSH versus eCG. Ratto et al., (1997) encontraron que el uso de eCG es tan efectivo como FSH o una combinación de FSH y eCG para la estimulación del desarrollo multifolicular pero no para el número de ovulaciones, en este parámetro para estos autores los tratamientos con FSH resultan con mayor tasa de ovulación, lo mismo para Correa et al. (1997). Agüero et al. (2001) observaron así mismo una menor receptividad sexual en alpacas cuando usaron eCG y señalan que probablemente sea debido a que eCG estaría induciendo luteinización temprana. Miragaya et al. (2006) indican que hay una alta incidencia de quistes foliculares en hembras tratadas con eCG si no tenían tratamiento previo con progesterona. Sin embargo nuestros resultados (Vivanco et al., 2009) muestran mayor tasa ovulatoria y embriones transferibles para nuestro protocolo superovulatorio que usa eCG en comparación con FSH, pero esto necesita mayor evaluación ya que los protocolos que usan eCG y los que usan FSH son diferentes en su estrategia de sincronización de la onda folicular, necesitamos hacer una comparación bajo la misma estrategia.

En referencia al estímulo ovulatorio en alpacas o llamas bajo tratamiento superovulatorio, la mayoría de estudios han usado monta natural para la

fecundación de las hembras donantes tratadas, por lo que el principal estímulo ovulatorio ha sido la cópula, algunas veces en combinación con una inyección de hCG o GnRH (Bravo et al. 1991, 1992; Aller et al. 2002a; Ratto et al. 1997; Correa et al. 1997; Gamarra et al., 2007; Vivanco et al., 2009). Nosotros (Vivanco et al. 2014b) encontramos que la aplicación de LH inmediatamente después de la cópula en alpacas superovuladas es más eficiente en inducir ovulación múltiple y reducir el número de folículos no ovulados al momento de la colección embrionaria que la aplicación de GnRH.

La estimulación ovulatoria usada en recipientes de embriones es similar a la descrita para hembras receptoras de semen en IA (monta con macho vasectomizado o la aplicación de GnRH o hCG o la combinación de monta y aplicación de dichas hormonas). Las receptoras son inducidas a ovular dos días posterior al día de las donantes, colectando embriones de día 8 en receptoras de día 6 (Trasorras et al., 2010), en nuestro caso medio día posterior al día de las donantes, colectando embriones de día 6 en receptoras de día 5.5. Ratto et al. (2006a) no encontraron diferencia entre solo monta natural, inyección de sólo 5 mg de LH (sin cópula) o inyección de 50 ug de GnRH sin cópula, en la proporción de llamas receptoras que ovularon (80 a 90%) y en el intervalo entre la inducción a ovulación y el momento de ovulación (29 a 30 horas). Nosotros (Gamarra et al., 2007) indujimos ovulación en 112 alpacas recipientes usando cópula con machos vasectomizados en combinación con inyección de 10 ug of GnRH inyectado intramuscularmente inmediatamente después de la cópula encontrando a la inspección 7 días más tarde que el 82.14% de las alpacas habían ovulado, el 3.57% con ovulaciones dobles, el 50% de las ovulaciones ocurrieron en el ovario izquierdo y el 50% en el derecho.

Los resultados de todos los estudios revisados muestran que hemos logrado desarrollar sistemas adecuados de inducción de la ovulación en recipientes con resultados consistentes y repetibles. En donantes en cambio los resultados son aún algo variables por lo que se requiere más investigación para lograr una estrategia adecuada de superovulación que produzca alta y repetible cantidad de embriones transferibles por donante tratada. Nuestros resultados a la fecha muestran que ya estamos en un promedio cercano a 4 embriones transferibles por alpaca donante, este es un logro importante comparado a los promedios de hace 5 años atrás, por lo que con mayor apoyo a la investigación y desarrollo tecnológico debemos ser capaces de alcanzar mayores tasas de producción embrionaria comparables con los resultados en otras especies de rumiantes. La variabilidad entre individuos podrá ser reducida si se determina para alpacas

el nivel de Hormona Anti Mulleriana que sirva como predictor de la respuesta superovulatoria tal como ha sido obtenido para el caso del vacuno (Monniaux et al. 2008).

LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VIVO SIN SUPEROVULACIÓN

Algunos autores han optado por colectar el embrión formado luego de una ovulación y cópula dentro del ciclo ovárico normal de la alpaca sin previa inducción hormonal de superovulación. Taylor et al. (2000) colectaron 22 llamas durante 2 años consecutivos, haciendo el seguimiento a los ovarios por ultrasonografía, sirviendo a las llamas por monta natural e inyectando 2 mg de LH al momento de la cópula efectuada cuando el folículo tenía 10 mm de diámetro o más; las receptoras recibieron sólo la dosis de LH; en total efectuaron 99 colecciones y obtuvieron 67 embriones (0.68 embriones por colección), transfirieron 49 embriones que resultaron en 18 preñeces (36.7%). Las colecciones fueron hechas ya sea los días 7, 8 o 9 post cópula encontrando que la tasa de recuperación embrionaria y la tasa de preñez aumentaron en relación directa con el intervalo entre cópula y colección embrionaria. Todos los embriones colectados fueron blástulas eclosionadas lo que confirma la observación de Del Campo et al. (1995) que indican que los embriones en CSA llegan a los cuernos del útero en un estado de desarrollo bastante avanzado en comparación con otras especies. Taylor et al. (2001) usaron en alpacas la misma estrategia que en llamas, colectando el embrión producido dentro de un ciclo normal sin estimulación de superovulación, la alpaca fue colectada dos veces consecutivas en un período de 37 días obteniendo 100% de tasa de colección y 100% de tasa de preñez; las transferencias fueron hechas a llamas recipientes.

La demostración de Taylor de la factibilidad del sistema y la importante observación de Vaughan et al. (2004) en el sentido de que el desarrollo folicular en los primeros 10 días desde la emergencia de la onda folicular es consistente y continuo sin importar el subsecuente intervalo entre ondas foliculares, ha permitido desarrollar el sistema llamado "lavado embrionario simple" que consiste en colectar embriones de las alpacas donantes cada 10 a 12 días sin estimulación hormonal. Vaughan (2012) informa que ha colectado a 822 alpacas donantes que presentaban en promedio 1.2 ± 0.3 CL, obteniendo 667 (67% tasa de recuperación) embriones consiguiendo un promedio de 0.81 embriones por donante, el mismo autor indica que las donantes a ser sometidas a lavado embrionario simple pueden ser sincronizadas para poder lavar varias donantes el mismo día, la sincronización se puede lograr induciendo la ovulación en un

grupo de donantes 10 a 12 días antes de la cópula fértil e induciendo luteólisis del CL 24 horas antes de la cópula fértil ; las donantes son servidas una sola vez y se hace el lavado uterino 7 a 8 días después.

Con los avances actuales en el rendimiento de embriones transferibles por donante superovulada como se puede ver en el cuadro 2, la ventaja de hacer lavado embrionario simple podría ser cada vez menor ya que en los programas de mejora genética es necesario maximizar el número de descendientes de hembras élite por unidad de tiempo.

LAS TÉCNICAS USADAS PARA EL LAVAJE UTERINO EN LA COLECCIÓN EMBRIONARIA IN VIVO Y PARA LA TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

La técnica más usada en CSA domésticos (alpacas y llamas) es la cateterización del útero por la ruta transvaginal; la técnica es descrita en detalle por Taylor et al (2000) y Gamarra et al. (2006). Taylor y colaboradores usaron catéteres de 20 Fr en llamas y también en alpacas (Taylor et al. 2001); nosotros (G. Gamarra et al. 2006) usamos normalmente en alpacas catéteres Foley de 14 Fr con bulbo inflable de 5 cc, reduciendo a 12 Fr para alpacas que presenten estrecho lumen cervical.

La otra técnica empleada para lavaje uterino en CSA es la técnica quirúrgica por laparotomía ventral, esta técnica fue usada desde los primeros esfuerzos en colección embrionaria en CAS (Novoa y Sumar, 1968). Nosotros (Vivanco et al, 2014) hemos usado colección embrionaria quirúrgica por laparotomía ventral en alpacas pero la hemos descontinuado porque no encontramos ninguna ventaja significativa de su uso en comparación a la técnica transcervical. El medio de lavaje uterino usado por nosotros (Vivanco et al., 2014) en CAS es el medio de lavado comercial de embriones.

Para la transferencia de los embriones, la técnica más usada es la técnica no quirúrgica por cateterización transcervical del útero, es muy similar a la técnica usada en vacas, empacando previamente los embriones en pajuelas de 0.25 cc y usando catéteres y pistoletas comercialmente disponibles. Nosotros (W. Vivanco et al, 2014) hemos usado tanto la técnica transcervical no quirúrgica como la técnica quirúrgica con ayuda laparoscópica la cual es superior en términos de preñez a la técnica transcervical no quirúrgica (cuadro 3); inicialmente transferíamos el embrión en el cuerno uterino ipsilateral al CL pero debido a que la mayoría de las gestaciones son llevadas en el cuerno uterino izquierdo independientemente

del lado de la ovulación (Fernández Baca et al; 1979), actualmente transferimos todos los embriones en el cuerno uterino izquierdo independientemente del lado en que se encuentre el CL ya que no encontramos diferencia significativa alguna en preñeces. El medio que usamos para manipular los embriones y para la transferencia embrionaria es el “medio de mantenimiento” (1 L PBS + 1 G Glucosa + 36 mg Piruvato de Sodio + 0.4% BSA + 50 mg de Monosulfato de Kanamicina).

Los embriones de alpaca llegan al útero en estadio avanzado, colecciones a los 6 y 6.5 días post fertilización resultan en la colección de blástulas expandidas y eclosionadas, colecciones a los 7 días producen blástulas eclosionadas y elongadas. La morfología embrionaria es muy similar entre alpacas y llamas pero los embriones de llama son de mayor tamaño a igual edad embrionaria (Cuadro 3).

Cuadro N° 3: Tamaño de los embriones en llamas y alpacas, a los 6 y 6.5 días de desarrollo embrionario

Especie	Edad de embrión en días	Número de embriones	Promedio de Longitud micras	± DE de longitud micras	Promedio de Ancho micras	± DE de Ancho micras
Llamas	6.5	11	210.6	70.5	173.7	55.2
	6.0	8	154.4	18.1	127.4	14.3
Alpacas	6.5	5	131.5	49.5	113.8	36.8
	6.0	10	101.5	22.4	90.1	24.9

Fuente: Vivanco et al. 2020.

Foto 1. Materiales usados para la colección no quirúrgica de embriones por cateterización transcervical: Medio de lavaje, cateter foley de 14 Fr y bulbo de 5 cc; jeringas hipodérmicas y agujas; embudo con filtro para embriones, vasos y frascos de colección. Fotografías de Vivanco International SAC.



Selección de donantes y superovulación



Foto 2. Etapas de la selección de donantes, superovulación y fertilización
Fotografías de Vivanco International SAC.

Colección de los embriones por lavado uterino vía cateterización transcervical



Foto 3. Colección de embriones por cateterización cervical y sifoneo
Fotografías de Vivanco International SAC.

Filtrado, búsqueda y calificación de embriones



Filtrado de los fluidos aspirados Del útero



Transferencia de los fluidos para Inspección y Enjuague del filtro



Búsqueda y clasificación microscópica de Los embriones



Embriones de alpacas colectados a los 6.5 y 7.0 días post monta con machos fértiles

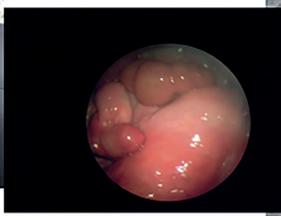


Foto 4. Filtrado, búsqueda y calificación de embriones de alpaca.
Fotografías de Vivanco Internacional SAC.

Transferencia de los embriones por método quirúrgico laparoscópico



Inserción del laparoscopio para observación del CL del ovario y sujeción del cuerno uterino para su exteriorización



Ovario izquierdo mostrando 2 CL funcionales



Pequeña incisión para la exteriorización del cuerno uterino Usando un "Babcock fórceps"



Haciendo el orificio de entrada para el catéter de transferencia usando una varilla con punta roma



Cateter de transferencia insertado en el cuerno uterino



Introduciendo el embrión en el lumen del cuerno uterino

Foto 5. Mostrando las etapas de la transferencia embrionaria quirúrgica en alpacas con apoyo laparoscópico. Fotografías de Vivanco Internacional SAC.



Foto 6. Transferencia embrionaria no quirúrgica transcervical intrauterina, conduciendo la pipeta de transferencia hasta la porción superior del cuerno uterino izquierdo. Fotografías de Vivanco International SAC.

LOS RESULTADOS DE PREÑEZ

Bravo et al. (1990) describen para las alpacas que el CL empieza a regresionar rápidamente (11 a 12 días después de la cópula o sea 9 a 10 días después de la ovulación), por lo que si un embrión no está enviando señales al útero de la recipiente para el día 8 o 9, es muy probable que ocurrirá la regresión del CL y que la preñez no se establezca (Aba et al., 1997; Del Campo et al., 1995). Nosotros (Vivanco et al., 2014) hemos comparado la transferencia de embriones a recipientes que fueron inducidas a ovular el mismo día que las donantes, un día antes que las donantes y un día después que las donantes; este último grupo nos dio el más alto porcentaje de preñez (44.44%) cuando los embriones fueron transferidos por técnica con ayuda laparoscópica (Cuadro 4). Nosotros recolectamos los embriones el día 6.5 post cópula; 91% de las estructuras recuperadas son embriones transferibles al estadio de blástula eclosionada y blástula expandida. El rápido desarrollo de los embriones está probablemente relacionado con la necesidad de enviar señales al útero lo más pronto posible para que la madre reconozca y acepte la preñez. Vaughan (2012) informa

que su promedio de preñez es de 41.8% para 3,963 recipientes que recibieron embriones producidos por superovulación y 42.4% de preñez para 553 recipientes que recibieron embriones del sistema de lavado embrionario simple sin superovulación.

La mayoría de los autores reportan porcentajes de preñez pero no de nacimientos. Nosotros (Vivanco et al., 2015b y c) hemos observado que en alpacas se presentan pérdidas de preñez no sólo en los primeros dos meses después de la transferencia sino que y sobre todo en el caso de embriones criopreservados, las pérdidas de preñez ocurren también en estadíos más avanzados (Cuadro 5).

Cuadro 4. Porcentaje de preñez en alpacas en función del tipo de embrión, el grado de sincronización donante-recipiente y el método de transferencia embrionaria usado.

TIPO DE EMBRIÓN	MÉTODO DE TRANSFERENCIA	SINCRONISMO DONAD.-RECEP.	HEMBRAS TRANSFERIDAS	TASA DE PREÑEZ POR SUB GRUPOS	TASA DE PREÑEZ POR GRUPOS
FRESCO	CERVICAL	-1	6	0 % (0/6)	23.3 % (7/30)
		0	9	33.3 % (3/9)	
	LA PAROSCÓPICA	-1	9	44.4 % (4/9)	
		0	6	0 % (0/6)	
CONGELADO	CERVICAL	-1	13	7.7 % (1/13)	9.1 % (2/22)
		0	9	11.1 % (1/9)	
VITRIFICADO	CERVICAL	-1	4	0 % (0/4)	0 % (0/13)
		0	9	0 % (0/9)	
			65	13.8% (9/65)	

W. Vivanco, et al. 2014

Grupos de recipientes con sus crías recién nacidas en Mallkini



Foto 7. Alpacas recipientes de embriones con sus respectivas crías nacidas de transferencia embrionaria en el Fundo Mallkini de la Compañía Michell y Cía. Azángaro, Perú. Fotografías de Vivanco International SAC.

Con el fin de incrementar los porcentajes de nacimientos logrados con la transferencia de embriones en alpacas, nosotros (Vivanco et al.; 2018) hemos ensayado la aplicación de drogas antiinflamatorias no esteroideas (NSAID “nonsteroidal anti inflammatory drugs”) tales como el meloxicam (0.5 mg/kg de peso vivo) y el ácido tolfenaico (3 mg/Kg de peso vivo) inyectadas a las recipientes inmediatamente después de la transferencia embrionaria con el fin de bloquear la producción de prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) y consecuentemente mantener la actividad del cuerpo lúteo; el meloxicam tuvo mejor comportamiento pero no incrementó significativamente la preñez en relación al promedio de preñeces obtenidas con transferencia embrionaria en el rebaño, es necesario continuar la investigación con mayor número de animales tratados. Otra estrategia ensayada por nosotros (Michell y Cia., 2018) ha sido la suplementación de progesterona (inserción de CIDR) a la recipiente al momento de la transferencia embrionaria y la inyección de PMSG también al momento de la transferencia embrionaria para estimular la actividad luteal del CL; el tratamiento con PMSG fue superior

pero no alcanzó significación estadística por lo que es necesario continuar estos ensayos con un mayor número de animales; es aún un interesante reto encontrar sistemas que nos permitan evitar la regresión del CL y reforzar su función para evitar la pérdida de preñeces en alpacas. En nuestros ensayos (Michell y Cia., 2018) hemos determinado la tasa de preñez obtenida cuando los embriones de alpaca son transferidos a receptoras llamas en comparación a las transferencias de embriones de alpacas a receptoras alpacas obteniendo mayor tasa de preñez cuando los embriones de alpacas son transferidos a receptoras llamas, nuestra interpretación es que las llamas serían menos susceptibles al estrés del manejo y transferencia embrionaria, pero esto debe ser demostrado científicamente.

En el Cuadro 5 se puede apreciar que las preñeces de los embriones frescos la mayoría se perdieron durante los primeros 60 días de gestación, pero aún hubieron pérdidas después de los 77 días (11 semanas) de gestación. En el caso de los embriones criopreservados ninguna gestación llegó a los 77 días.

Hasta el año 2019 no se había logrado a nivel mundial el nacimiento de crías alpaca por transferencia embrionaria de embriones in vivo criopreservados ya sea por congelamiento o por vitrificación; nuestro grupo acaba de lograr el nacimiento de las dos primeras crías de alpacas producto de embriones in vivo vitrificados y transferidos a recipientes alpacas tanto en Estados Unidos (Lutz et al; 2020; Foto 8) como en el Perú en Mallkini (Vivanco et al; 2020).



Foto 8. Primera cria alpaca nacida en el mundo producto de transferencia embrionaria de embrión criopreservado producido por MOET , vitrificado, desvitrificado y transferido a receptora alpaca. Fuente: JC Lutz, SL Johnson, KJ Duprey, PJ Taylor, HW Vivanco, D. Ponce-Salazar, M. Miguel, and C.R. Youngs. 2020.

La criopreservación de embriones de CAS se trata en otros capítulos por lo que aquí sólo mencionamos el hito que hemos logrado.

Cuadro 5. Evolución del porcentaje de sobrevivencia embrionaria en alpacas hasta el nacimiento de acuerdo al tipo de embrión y método de transferencia embrionaria.

Tipo de embrión y método de transferencia	Número de embriones transferidos (un embrión por recipiente)	Sobrevivencia embrionaria a las 3 semanas post fertilización n (%)	Sobrevivencia embrionaria a las 9 semanas post fertilización n (%)	Sobrevivencia embrionaria a las 11 semanas post fertilización n (%)	Sobrevivencia embrionaria hasta el parto n (%)
Fresco Método no quirúrgico	33	11 (33.3)	7 (21.2)	7 (21.2)	7 (21.2)
Fresco Método quirúrgico	49	18 (36.7)	14 (28.6)	14 (28.6)	11 (22.4)
Congelado método no quirúrgico	22	2 (9.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Congelado Método quirúrgico	10	2 (20.0)	1 (10.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Vitrificado Método no quirúrgico	13	2 (15.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

Fuente: Vivanco et al, 2015b y c

Aplicación de tecnologías complementarias a la producción de embriones IN VIVO para el incremento de la producción de crías y de la productividad

Indudablemente la producción de embriones IN VITRO abre una nueva etapa en la reproducción de todos los mamíferos no sólo por sus características y aportes ya descritos más arriba sino también porque constituirá la base sobre la cual se podrán construir y aplicar tecnologías reproductivas más avanzadas que requieren de los procesos de maduración de gametos y cultivo IN VITRO de los embriones resultantes; sin embargo, es posible usar tecnologías avanzadas también con embriones producidos IN VIVO y sin necesidad de tener facilidades IN VITRO para maduración de gametos e incubación de embriones.

La bisección embrionaria (“clonación verdadera”)

La bisección embrionaria de embriones IN VIVO por el método desarrollado y aplicado por Vivanco et al. (1991; 1992) en ovinos es un método muy simple y puede ser hecha ya sea utilizando un micromanipulador y microscopio invertido o a mano alzada en un plato Petri y con una hoja de afeitar (“clonación hecha a mano”); consiste en seleccionar embriones luego de su colección escogiendo embriones de grado A (de acuerdo a clasificación de IETS) y en estado de blástula expandida y con masa central de células nítidas y bien formadas, someter el embrión a un baño en gota con medio de mantenimiento con alto porcentaje de suero (20% de FCS) y luego transferirlo al plato Petri a una gota de bisección (medio de mantenimiento sin proteína que permite que el embrión sea atraído y fijado al fondo del plato), luego efectuar la bisección ya sea en el micromanipulador o a mano, cortando el embrión en dos cuidando que la masa central de células esté repartida homogéneamente entre las dos mitades; inyectar a la gota de bisección medio con alta proteína para despegar el embrión del fondo, extraer cada mitad, cargarla en pajuelas ya sea como dos mitades o una mitad en cada pajuela y efectuar la transferencia a la receptora. Este procedimiento se conoce también como clonación verdadera porque genera gemelos idénticos. Luego de haber aplicado esta tecnología en miles de embriones en ovinos (Vivanco et al 1991;1992) la acabamos de aplicar el año 2019 en embriones de alpacas en el Fundo Mallkini de la Compañía Michell en Azángaro Perú generando la primera cría nacida a nivel mundial (en febrero de 2020) de embrión biseccionado en alpacas (trabajo en publicación).

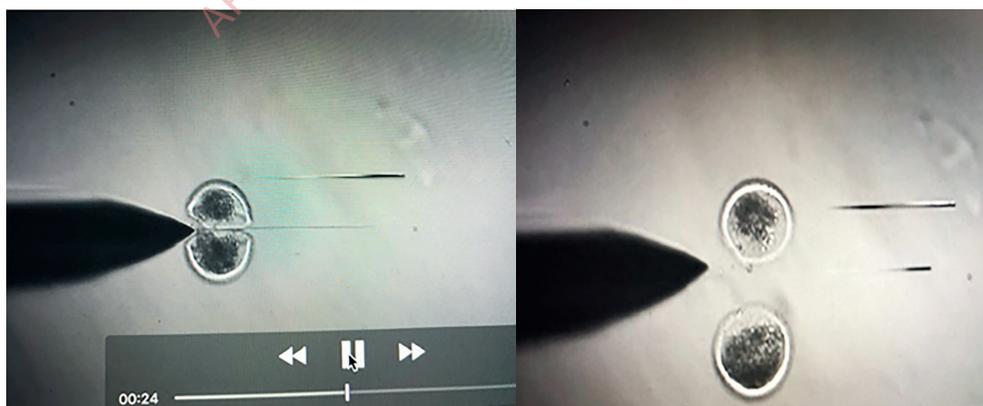


Foto 9. Bisección embrionaria, método simple de clonación de embriones (Vivanco et al. 1991; 1992). Fotografía de Lactea SA y Vivanco Imnternational SAC.

Pre determinación del sexo de la cría

La predeterminación del sexo de las crías a nacer es crucial en los planes de rescate de poblaciones y en los planes de producción de animales en Núcleos Genéticos Elite (NGE). Así, en el Perú el principal producto de los NGE de alpacas y llamas deberá ser machos mejoradores para ser distribuidos a los productores, requiriéndose por consiguiente una mayor proporción de nacimientos de machos, con población de hembras solo para cumplir con los programas de reemplazos. En el caso de la vicuña y el guanaco en cambio el principal producto deberán ser hembras hasta llegar a una población suficiente, siendo la población de machos necesaria en menor proporción.

No hay experiencias aún en sexado de semen (separación de espermatozoides X e Y) en camélidos sudamericanos, por lo que la investigación en esta área es de gran interés aunque limitaciones de patentes y otros arreglos comerciales hacen difícil el acceso a la tecnología. Actualmente los niveles de fertilización alcanzados en bovinos con el uso de semen sexado aunque no son altos permiten su aplicación ya sea en inseminación directa (Seidel y Jonson 1999) o en fertilización in vitro (Arlotto et al. 1996). Cran et al. (1997) y Vivanco (1999b) extrapolaron la técnica de sexado espermático para ser usada en ovinos exitosamente; es de esperar que lo mismo suceda en su aplicación para sexado de semen del camélido.

El sexado de embriones por medio de biopsia embrionaria y determinación de la presencia (o ausencia) del cromosoma "Y" por técnicas de biología molecular es una práctica usada desde hace más de una década en bovinos (Thibier y Nibart, 1995), su aplicación en otras especies requiere del desarrollo de "marcadores" específicos para el cromosoma "Y" de la especie en cuestión; no hay referencias de que se hayan desarrollado y/o usado estos marcadores de sexo en camélidos, aunque si se han usado técnicas moleculares para identificación de especies (J. Wheeler 1995).

Otras tecnologías reproductivas: tecnologías reproductivas avanzadas han sido aplicadas fundamentalmente como parte de la producción embrionaria IN VITRO, así Miragaya et al. (2003), efectuaron inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en ovocitos de camélidos sudamericanos para la obtención de embriones in vitro; Sansinena et al. (2003) han ensayado IN VITRO reconstrucción de embriones de llama por transferencia nuclear de células somáticas para clonación aunque ninguno alcanzó a producir crías producto de

estas tecnologías. Pero en dromedarios ya se ha logrado la primera cría clonada por transferencia nuclear (Wani et al., 2010). Tal vez una de las limitaciones del éxito del uso de estas tecnologías avanzadas sea la carencia de un sistema eficiente y robusto de producción de embriones IN VITRO en camélidos; sin embargo, potencialmente es factible trabajar estas tecnologías también en sistemas IN VIVO, así, podríamos madurar los ovocitos in vivo, colectarlos, denudarlos y someterlos a ICSI para luego transferirlos a los oviductos de llamas o alpacas. Igualmente podríamos utilizar ovocitos madurados in vivo para enuclearlos y utilizarlos para transferencia nuclear con células somáticas o blastómeros (obtenidos de embriones in vivo) y luego transferirlos a oviducto de llamas o alpacas. La micromanipulación de embriones para la construcción de quimeras y su subsecuente cultivo IN VIVO es también otra posibilidad. Todas éstas son áreas muy interesantes para la investigación y constituyen un reto para los investigadores de las nuevas generaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams G.P., Griffin P.G., Ginther O.J. 1989. In situ morphologic dynamics of ovaries, uterus and cervix in llamas. *Biol Reprod.* 41: 551-558.
- Adams G., Sumar J. And OJ Ginther.1990. Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*) *Jour. Reprod. And Fert.* 90: 535-545.
- Adams G.P. and Ratto M.H. 2001. Reproductive biotechnology in South American Camelids. *Rev. Inv. Vet. Peru.* 1: 134-141.
- Adams G.P., Ratto M. H, Huanca W., Singh J. 2005. Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biol. Reprod.* 73: 452-457.
- Agüero A., Chaves M G., Capdevielle E F., Russo A F., Aba M.A. 2001. Superovulación en Llamas: comparación de dos tratamientos. *In. Vet.* 3: 13-18
- Alberio R.H., Aller J.F., 1966. Control y sincronización de la onda folicular mediante la aplicación de progesterona exógena en llamas. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 16 (4): 325-329.
- Aller J.F., G.E. Rebuffi and A.K. Cansino. 2002a. Superovulation response to progesterone-eCG treatment in vicuna (*Vicugna vicugna*) in semi captive conditions. *Theriogenology* 57 (1): 576.

- Aller J.F., G.E. Rebuffi, A.K. Cancino and R.H. Alberio. 2002b. Successful transfer of vitrified Llama (*Lama glama*) embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 73(1-2):121-127.
- Aller, J.F., Rebuffi, G.E., Cansino, A.K. and Alberio, R.H. 2003. Influence of the cryopreservation on the motility, viability and fertility of llama (*Lama glama*). *Arch. Zootec.* vol.52. pp15-23.
- Arlotto T., Beaumont S., Vivanco H W. 1996. Bovine in vitro fertilization with low numbers of flow cytometrically sorted sperm. In: Poster Communications, The 13th International Congress on Animal Reproduction. Sydney, Australia. P8-2.
- Bourke, D.A., Adam C.L., Kyle, C.E., Young, P., McEvoy T.G. 1992. Superovulation and embryo transfer in the Llama. In: Proceedings of the First International Camel conference. R&W Publications Newmarket Ltd. pp 183-185.
- Bourke D.A., Kyle C.E., McEvoy T.G., Young P., Adam C.L. 1995. Recipient synchronization and embryo transfer in South American camelids. *Theriogenology* 43: 171.
- Bravo P.W., M.E. Fowler, G.H. Stabenfeldt y B.L Lasley.1990. Ovarian Follicular Dynamics in the Llama. *Biol. of Reprod.* 43: 579-585.
- Bravo P W., G.H. Stabenfeldt, B.L. Lasley and M.E. Fowler. 1991. The effect of the ovarian follicle size on pituitary and ovarian responses to copulation in domesticated South American camelids. *Biol. Of Reprod.* 45: 553-559.
- Bravo P.W., G.H. Stabenfeldt, M.E. Fowler y B. Lasley. 1992. Pituitary response to repeated copulation and/or gonadotropin-releasing hormone administration in Lamas and Alpacas. 1992. *Biol. Of Reprod.* 47: 884-888.
- Bravo P.W., J.A. Skidmore, X. X. Zhao. 2000. Reproductive aspects and storage of semen in camelidae. *Animal Reprod. Science* 62: 173-193
- Carnero S, Huanca W, Cordero A, Vásquez M, Huanca T. 2011. Transferencia embrionaria ipsilateral y contralateral a la posición del cuerpo lúteo y supervivencia embrionaria en llamas. *Rev Inv Vet Perú* 22: 114-120. doi: 10.15381/rivep.v22i2.278
- Correa, J.E., Gatica, R., Ratto, M., Ladrix, R., Schuler, C., 1992. Studies on nonsurgical recovery of embryos from South American camelids. In: Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction, vol. 2, The Hague, 23–27 August, pp. 788–790.

- Correa, J.E., Ratto, M.H., Gatica, R., 1994. Actividad estral y respuesta ovárica en alpacas y llamas tratadas con progesterona y gonadotrofinas. Arch. Med. Vet. 26, 59–64.
- Correa, J. E., M.H. Ratto and R. Gatica. 1997. Superovulation in Llamas (*Lama glama*) with pFSH and equine chorionic gonadotropin used individually or in combination. Anim. Rep. Sci. 46 (3-4):289-296.
- Cran D.G., McKelvey, W.A.C., King M.E., Dolman, D.F., McEvoy TG., Broadbent P.J. and Robinson J.J. 1997. Production of lambs by low dose intrauterine insemination with flor cytometrically sorted and unsorted sperm. Theriogenology 47: 267.
- Chavez, M.G., Aba, M.A., Agüero A., Egey J., Berestin V., Rutter B. 2002. Ovarian follicular wave patterns and the effect of exogenous progesterone on follicular activity in non-mated llamas. Anim. Reprod. Sci. 69: 37-46.
- Del Campo M.R, C.H Del Campo, G.P. Adams and R.J. Mapletof. 1995. The Application of New Reproductive Technologies to South American Camelids. Theriogenology 43: 21-30.
- England Barry G, Armando G Cardoso and Warren C. Foote. 1969. A review of the physiology of reproduction in the New World Camelidae. In: International Zoo Yearbook, 9: 104-110. The Zoological Society of London. 1969.
- Fernández-Baca A, Saúl. 1971. La Alpaca reproducción y Crianza. Boletín de Divulgación No7. IVITA Dirección de Investigación Univ. Nac. M. de S. Marcos. Lima, Perú. 43 pp.
- Fernández-Baca S, W. Hansel, R. Saatman, J. Sumar and C. Novoa. 1979. Differential Luteolytic Effects of Right and left uterine horns in the alpaca. Biology of Reprod. 20: 586-595.
- Gamarra G., A. Gallegos, M. Asparrin, H. W. Vivanco Mackie. 2006. Desarrollo de tecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos. Proyecto colaborativo CIETE, Michell y Cia, Bioniche y Vivanco Consultants. Malkini. Puno.
- Gamarra G., A. Gallegos, M. Asparrin, W. Vivanco; 2007. Development of superovulatory strategies in alpacas. Proceedings of the annual Conference of the International Embryo Transfer Society. Kyoto, Japan. January 2007. Reproduction Fertility and Development. Jan. 2007 19 (1) 238.
- Huanca, T.; R.H. Mamani; O. Cárdenas; M.L. González; R. Sapana Evaluation of birth weight, weaning weight, year of age weight and growth curve

- of alpacas and llamas offspring born from embryo transfer interspecies. 2012. Asociación Peruana de Reproducción Animal . SPRA SPERMOVA Spermova 2012; 2(1): 44 - 46
- Huanca T, Gonzáles M, Mamani-Cato RH, Cárdenas O, Sapaná R, y Naveros M. 2014. Evaluación de la recuperación de embriones en alpacas y llamas donadoras simples y superestimuladas. En: Mem XXXVII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Abancay: APPA. p 252-2
- Leyva, V., Franco, E., Sumar, J. 1977. Inseminación artificial en camélidos sudamericanos. Mem. Primera Reunión Científica Anual de La Asoc. Peruana de Producción Animal. 32-39. Lima, Perú.
- Lutz JC, Johnson SL, Duprey KJ, Taylor PJ, Vivanco - Mackie HW, Ponce-Salazar D, Miguel M, Youngs CR. 2020. Birth of a live cria after transfer of a vitrified - warmed alpaca (*Vicugna pacos*) preimplantation Embryo. *Front. Vet. Sci.* 7:581877. doi: 10.3389/fvets.2020.581877.
- Michell y Cía. 2018. Boletín informativo del Programa Colaborativo de Investigación y Desarrollo sobre el Proyecto "Incremento de la productividad y calidad de la producción de alpacas mediante la implementación de núcleos genéticos élite para la selección y diseminación genética mediante la producción de reproductores certificados y el uso de tecnologías reproductivas. PIPEA-8-8-P-045-009-13. Segunda Edición. 2018. Arequipa. Perú.
- Miragaya M.H., Herrera C., Quintanas C., Chaves M.G., Capdeville E.F., Giuliano S.M., Pinto M., Egey J., Rutter B., Pascualini, S., Agüero A. 2003. Producción in vitro de embriones de llama (*Lama glama*) por la técnica de ICSI: Resultados preliminares. Memorias del III Congreso Mundial Sobre Camélidos. Potosí, Bolivia. 1: 267-270.
- Miragaya M.H., M.G. Chaves, A. Agüero. 2006. Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Ruminant Research* 61: 299-310.
- Monniaux, D., di Clemente, N., Touzé JL., Belville, C., Rico, C., Bontoux, M, Picard, J.Y. and Fabre, S. 2008. Intrafollicular steroids and anti - Müllerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biol. Reprod.* 79, 387-396.
- Novoa C., Sumar J., 1968. Colección de huevos in vivo y ensayo de transferencia en alpaca. En: Boletín Extraordinario IVITA. Univ. Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. p: 31-34.

- Novoa, C., Franco, E., García, W., Pezo, D. 1999. Dosis de gonadotropinas (eCG Y hCG), superovulación y obtención de embriones en alpacas. *Rev. Inv. Vet. del Perú*. Vol. 10, Nº 1 Enero-Julio
- Pacheco Joel, Víctor Vélez, Danilo Pezo. 2016. Evaluación de la eficiencia de la transferencia de embriones interespecie entre alpacas y llamas obtenidos por ovulación simple evaluation of the efficiency of interspecies embryo transfer between alpacas and llamas obtained through single ovulation. *Rev. Inv. Vet Perú* 2016; 27(1): 64-69
- Pineda J, Pozo A, Huanca T, Naveros ML. 2012. Recuperación sucesiva de embriones y retorno folicular post lavado en alpacas (*Vicugna pacos*) Huacaya donadoras naturales. *Spermova* 2(1): 53-54.
- Ratto, M.H., R. Gatica and J. Correa. 1997. Timing of mating and ovarian response in Llamas (*Lama glama*) treated with pFSH. *Anim. Reprod. Sci.* 48 (2-4): 325-330.
- Ratto M H., Singh J., Huanca, W., G.P. Adams. 2003. Ovarian follicular wave synchronization and pregnancy rate after fixed-time natural mating in Llamas. *Theriogenology* 60: 1645-1656.
- Ratto Marcelo, Wilfredo Huanca, Jaswant Singh, Greg Adams. 2006a. Comparison of the effect of natural mating and GnRH on interval to ovulation and luteal function in Llamas. *Anim. Reprod, Sci.* 91: 299-306.
- Ratto M.H, Huanca W., J Singh, G.P. Adams. 2006b. Comparison of the effect of ovulation-inducing factor (OIF) in the seminal plasma of llamas, alpacas and bulls. *Theriogenology* 66 (5): 1102-1106.
- Rodríguez, A.R.P. 1959. Ovulación en las alpacas. Tesis Med. Vet. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Sansinena M.J., Taylor S.A., Taylor P.J., Denniston, R.S., Godke R.A. 2003. Production of nuclear transfer llama (*Lama glama*) embryos from in vitro matured llama oocytes. *Cloning Stem Cells* 5(3): 191-198.
- Seidel G.E. and Johnson I.A. 1999. Sexing mammalian sperm- overview- *Theriogenology* 52: 1267-1272.
- Sumar J, Arellano P, Montenegro V, Londoño P, Picha Y, Rodriguez C, Sanchez D, Torres R. 2012. Reciprocal embryo transfer in alpacas and llamas. In: ICAR 2012. Satellite Meeting on Camelid Reproduction. Vancouver, Canada.
- Taylor S., P.J. Taylor, A.N. James and R.A. Godke. 2000. Successful commercial embryo transfer in the Llama (*Lama glama*). *Theriogenology* 53(1): 344.

- Taylor P.J., S. Taylor, A.N. James, R.S. Denniston and R.A Godke. 2001. alpaca offspring born after cross species embryo transfer to Llama recipients. *Theriogenology* 55 (1): 401.
- Thibier M. and Nibart M. 1995. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology* 43: 71-80.
- Trasorras V., Chaves M G, Neilda D, Gambarotta M, Aba M, Agüero A. 2010. Embryo transfer technique: Factors affecting the viability of the corpus luteum in llamas. *Animal Reproduction Science* 121, 279-285
- Vaughan J.L., K.L. McMillan, M.J. D'Occhio. 2004. Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Animal Repro. Sci.* 80: 353-361.
- Vaughan J.L. 2012. Practical Aspects of embryo transfer and artificial insemination in South American camelids. En: Resúmenes del VI Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos. Arica, Chile. 21-23 Noviembre. Pp. 71-84.
- Vivanco W., Cárdenas, H. y Bindon B. 1985. Relación entre duración de la cópula y momento de ovulación en alpacas. V Convención Internacional sobre camélidos Sudamericanos. Cusco Perú. Libro de Resúmenes. p 19-20
- Vivanco, H.W.; Rangel, R.; Lynch, P. and A. Rhodes. 1991. Large scale commercial application of bisection of sheep embryos. *Theriogenology* 35 (1): 292.
- Vivanco, H.W. and K.B. Graeney. 1992. Comparison of survival of bisected and whole sheep embryos transferred in-season and out of season. *Theriogenology* 37 (1): 316.
- Vivanco H. William. 1999. Alpacas, Some Reproductive Aspects and application of Reproductive Technologies. Alpaca & Llama Association-New Zealand Inc. 1999 Conference Notes. Auckland. June 1999.
- Vivanco-Mackie H W. 1999b. Results of the development of the technique for Separation of X and Y bearing sperm in sheep by flow cytometric technique. AgResearch Report to Vernon Willey Trust. Hamilton New Zealand.
- Vivanco-Mackie H W., 2000. Development and application of Ovum Pick Up (OPU) and in vitro Embryo Production in the Bovine. A view of arTech Experiences. Proceedings of the Australian Embryo Transfer Society. Perth Conference." ET Beyond 2000", Observation City, WA. Australia. P209-227.
- Vivanco-Mackie Henry William. 2004. Impacto de las Tecnologías Reproductivas sobre la Eficiencia de Producción del Ganado Vacuno. En: Memorias IV Seminario Internacional sobre Competitividad en carne y leche. Colanta. Medellín. Colombia. p: 209-227.

- Vivanco Mackie Henry William. 2005. Desarrollo y aplicación de la tecnología de colección de ovocitos y producción de embriones in vitro en bovinos. En: Revista Notas Ganaderas. Barranquilla Colombia Edición No 20: 32-38 y edición No 21: 26-33.
- Vivanco-Mackie Henry William. 2006. Mejoramiento de la productividad animal y su relación con las tecnologías reproductivas. En: Resúmenes del Seminario Internacional de Ganadería Tropical. Montería Colombia. CORPOICA. Junio 2006.
- Vivanco H.W., E. Huamán, S. Leon, A. Gallegos, M. Asparrin, E. Alvarado and G. Gamarra. 2009. Evaluation of superovulatory regimes for in vivo embryo production in alpacas (Lama Pacos). *Reproduction, Fertility and Development*. 22 (1): 258
- Vivanco Mackie Henry William. 2013 Strategies for superovulation, embryo production and transfer in sheep and alpacas. AETE. 29 Scientific meeting. Istanbul. Turkey. 2013
- Vivanco Mackie Henry William, D. Ponce, M. Asparrin, M. Miguel. 2014. identificación de alpacas genéticamente mejoradas con mayor capacidad de reproducir características de fibra fina mediante el desarrollo de evaluaciones genéticas cruzadas y técnicas reproductivas de avanzada en el fundo Mallkini, en la comunidad campesina de Picotani y en SAIS Túpac Amaru. Informe final Proyecto 140-FINCYT-FIDECOM -PIPEA-2010.
- Vivanco-Mackie H.W., M.D. Ponce Salazar, M.M. Gonzales, M.A. Tapia. 2014b. Comparative efficiency of gonadotropin-releasing hormone and luteinizing hormone in the induction of ovulation in superovulated alpacas. *Reproduction, Fertility and Development*. 2014. 26 (1) : 108.
- Vivanco Mackie Henry William, Ponce Salazar, Miguel Daniel, Marlene Miguel Gonzales, Cesar Osorio, 2015. Desarrollo de la producción y criopreservación de embriones in vitro en alpacas. Proyecto FINCYT PIAP-2-P-233-14.
- Vivanco-Mackie H. W., M. D. Ponce Salazar, M. Miguel, C. Youngs and M. Asparrin. 2015a. Embryo survival to calving according to type of embryo and embryo transfer method in alpacas. *Reproduction, Fertility and Development*. 27 (1).
- Vivanco-Mackie H. W. M. D. Ponce-Salazar, M. Miguel-Gonzales, C. R. Youngs, C. Osorio, and M. Asparrin. 2017. Hormonal supplementation strategies

- for improvement of pregnancy rates in embryo transfer in alpacas. *Reproduction Fertility and Development*. Vol 29 (1) 2017. 164
- Vivanco-Mackie HW, Salazar M DP, Miguel-Gonzales M, Youngs CR, Asparrin M. 2018. Effect of treatment with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) on Pregnancy Rates of Recipient Alpacas Post-Embryo Transfer. *Reproduction, Fertility and Development*. 2018. Vol 30 (1). 183.
- Vivanco-Mackie, H.W. , M. D. Ponce-Salazar, M. Miguel-Gonzales, C. R. Youngs, C. Jara and M. Asparrin. 2019. Comparative study between slow freezing and vitrification on the survival rate of cryopreserved alpaca embryos post-transfer. *Reproduction Fertility and Development* Vol 31 (1) 2019.182
- Wani N A, Wernery U, Hassan FAH, Wernery R, Skidmore JA. 2010. Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction* 82, 373 - 379.
- Wheeler Jane C. 1995. Evolution and present situation of the South American camelidae. *Biol. Jour. of the Linnean Society*. 54: 271-295.

ARCHIVO SOLO PARA VISUALIZACIÓN INTERNA

CAPÍTULO VII

AVANCES EN FECUNDACIÓN IN VITRO EN ALPACAS Y LLAMAS

Jaime Ruiz Béjar

RESUMEN

En este capítulo se hace una revisión de resultados de investigación referentes a la maduración *in vitro*, medios para el cultivo de embriones, uso de agentes capacitantes, co-cultivo de células y embriones, y la sincronización de hembras receptoras de embriones FIV en camélidos sudamericanos. Se han incluido distintos componentes a los medios de maduración *in vitro* de ovocitos de camélidos sudamericanos pero no se ha evaluado su real efecto en la maduración de este gameto. El tiempo de maduración *in vitro* adecuado en llamas ya se había establecido hace algunos años en 30 horas, en esta revisión se incluyen resultados en los cuales se encontró que el tiempo de maduración de ovocitos de alpaca es menor a 26 horas. Se ha utilizado en distintos trabajos de investigación SOF-IVC, TCM-199, KSOM, DMEM y CR1aa para el cultivo de embriones de alpacas o llamas, al comparar estos medios en un mismo estudio excepto el DMEM, se encontró que SOF-IVC y KSOM son los mejores medios para el cultivo de embriones de alpacas. Tradicionalmente se ha utilizado la combinación de PHE (Penicilamina, Hipotaurina, Epinefrina) y heparina para la capacitación de espermatozoides de llama y alpaca, en esta revisión se presentan resultados de comparación de la cafeína y la heparina para la capacitación de espermatozoides de alpaca, pero no se encontró diferencias estadísticas entre ambos agentes. Distintos tipos celulares se han utilizado para el co-cultivo de células con embriones de alpacas y llamas en desarrollo *in vitro*, en esta revisión se presenta un experimento en el que se encontró que las células del oviducto, fibroblastos de la oreja y células fetales son las mejores para el co-cultivo de embriones de alpaca producidos por FIV. Existen escasos reportes de transferencia de embriones producidos por FIV en alpacas y llamas, un aspecto clave y necesario para investigar es la sincronización de hembras receptoras con el embrión producido por fecundación *in vitro*, sin duda este es uno de los aspectos a mejorar para obtener mayores preñeces y nacimientos de crías de alpacas y llamas a partir de un embrión producido *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

La fecundación *in vitro* (FIV) es el procedimiento por medio del cual ovocitos maduros son cultivados junto con espermatozoides y de esta forma fecundados, para esto los espermatozoides deben ser sometidos previamente a un proceso de preparación *in vitro* con el objetivo de iniciar su capacitación y desencadenar la reacción acrosómica (Palma 2001). La utilización de la FIV en camélidos sudamericanos podría ser una alternativa para el mejoramiento genético de camélidos domésticos y para la preservación de los camélidos silvestres (Ruiz 2011). Sin embargo existen pocos reportes de FIV en camélidos sudamericanos: Del Campo *et al.*, (1994); Gómez *et al.*, (2002); Conde *et al.*, (2006); Ratto *et al.*, (2007); Conde *et al.*, (2008); Gamarra *et al.*, (2008); Mendoza *et al.*, (2008); Machicado *et al.*, (2009); Huanca *et al.*, (2009); Huanca *et al.*, (2010); Huamán *et al.*, (2011); Berland *et al.*, (2011) y Santayana *et al.*, (2012) y hasta la fecha se han logrado producir escasas gestaciones (Mendoza *et al.*, 2013; Trasorras *et al.*, 2014) y el nacimiento de una cría llama (Landeo *et al.*, 2016) con protocolos desarrollados en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica (Ruiz 2018).

La fecundación *in vitro* maximiza el uso de los gametos de animales de calidad genética superior. Una alpaca hembra con empadre natural puede tener sólo una cría al año, sin embargo, es posible recuperar de 10 a 15 ovocitos/sesión en alpacas vivas a través de la aspiración transvaginal guiada por ultrasonografía y repetir la aspiración al menos 4 veces al mes. Esto nos permitiría tener hasta 60 ovocitos al mes los cuales pueden ser fecundados *in vitro* y tener de 10 a 15 embriones transferibles por mes y al año 120 a 180 embriones transferibles los cuales pueden perfectamente producir 50 a 60 gestaciones al año al transferir estos embriones en alpacas o llamas receptoras. Con respecto a la alpaca macho, debido a su pequeño testículo y su escasa producción de espermatozoides, este sólo puede hacer de 2 a 3 servicios fértiles por día los cuales muchas veces pueden ser realizados en alpacas receptoras pero que aún no tienen un folículo dominante con un tamaño mínimo de 7 mm y por lo tanto no ovulan y no quedan preñadas desperdiándose todos los espermatozoides del servicio.

La producción de embriones por fecundación *in vitro* en camélidos sudamericanos se encuentra aún a nivel de investigación. Generalmente, en los diferentes trabajos de investigación se ha utilizado medios de maduración y cultivo de embriones validados para vacunos y poco se ha investigado en obtener medios específicos para trabajar con gametos de camélidos sudamericanos para la producción

de embriones *FIV*, se debe tener en cuenta la naturaleza y características de los gametos de alpacas y llamas en la preparación de los medios y tener en cuenta la fisiología reproductiva de estas especies para proponer protocolos de sincronización del embrión producido *in vitro* y la futura receptora del embrión. Son necesarios mayores estudios que nos permitan obtener mayor cantidad de embriones *in vitro* de alpaca y/ llama y de mejor calidad genética para que puedan ser transferidos satisfactoriamente en hembras receptoras y lograr obtener mayor cantidad de gestaciones y de crías aplicando la fecundación *in vitro* en camélidos sudamericanos.

Maduración *in vitro* de ovocitos de alpacas

Los COCs (Complejos ovocito-cúmulo) de alpaca son recuperados de ovarios procedentes de mataderos o mediante la técnica de aspiración folicular de ovocitos (descrito en capítulo VIII) desde hembras vivas (Ruiz, 2011) o por laparoscopia (Ruiz y Correa, 2007). Los COCs son colectados inmaduros y necesitan un tiempo de maduración *in vitro* para alcanzar la Metafase II, que es la fase meiótica en la cual pueden ser fecundados con éxito por un espermatozoide capacitado (Ruiz, 2011). Para la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca se han utilizado diferentes tiempos tales como: 24-25 horas (Mendoza *et al.*, 2008; Huamán *et al.*, 2011), 27 horas (Ruiz y Correa 2007) y 30 horas (Gamarra *et al.*, 2008). Sin embargo, Huanca *et al.*, (2009) recomiendan 38 horas o más como tiempo óptimo para la maduración de ovocitos de alpaca y Santayana *et al.*, (2012) encontró mayor cantidad de ovocitos maduros con 34 horas comparado con 30 y 26 horas de maduración. Recientemente Ruiz y Artica (2021), evaluaron 26, 30, 34, 38 y 42 horas de tiempos de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca, encontrando que el tiempo óptimo de maduración es de 26 horas.



Figura 1. A. Obtención de ovarios en el camal. B. Colocando los ovarios en un termo para trasladarlos al laboratorio. C. Ovarios en solución fisiológica atemperada. D. Ovario previo a la aspiración de los folículos.

Mendoza *et al.* (2008), realizaron un estudio con el objetivo de comparar los métodos de gradiente de Percoll y Swim up para la recuperación de espermatozoides epididimarios para la fecundación *in vitro* en alpacas. Los COCs fueron madurados *in vitro* por espacio de 24 - 25 horas en un medio de maduración preparado con TCM -199 y suplementado con Piruvato de Na 0,2 mM, HEPES 25 mM, Sulfato de Gentamicina 50 $\mu\text{g/ml}$, FSH 0,02 unidades/ml, Estradiol 17- β 1 $\mu\text{g/ml}$ y suero fetal bovino al 10%. Los COCs fueron fecundados con espermatozoides epididimarios y los resultados obtenidos fueron 36.0% y 43.9% de segmentación para Percoll y Swim up respectivamente; y 6.3% y 6.9% de blastocistos para Percoll y Swim up respectivamente.



Figura 2. A. Aspiración de los folículos de un ovario de alpaca para recuperar COCs (Complejos ovocito cúmulo). B. Líquido folicular de alpaca. C. Colocando el líquido folicular en una placa petri. D. Búsqueda y recuperación de los COCs.

Huamán *et al.* (2011), realizaron un estudio con el objetivo de evaluar el efecto de dos atmósferas de cultivo sobre el desarrollo de embriones de alpacas producidos por fecundación *in vitro*. Los COCs fueron madurados *in vitro* por 25 horas en medio de maduración suplementado con suero fetal bovino (SFB), sulfato de Gentamicina, estradiol, FSH y Piruvato de Na. Los COCs fueron fecundados con 10 μl de espermatozoides epididimarios recuperados por el método de swim up. Los resultados para los embriones cultivados en una atmósfera con 5% de CO_2 fueron: 86.36%, 78.26% y 10.04%; y para los embriones cultivados en una atmósfera con 90% N_2 , 5% CO_2 y 5% O_2 fueron: 91.28%, 86.11% y 11.22% de división, mórula y blastocistos respectivamente; sin diferencias estadísticas significativas entre ambas atmósferas de cultivo.

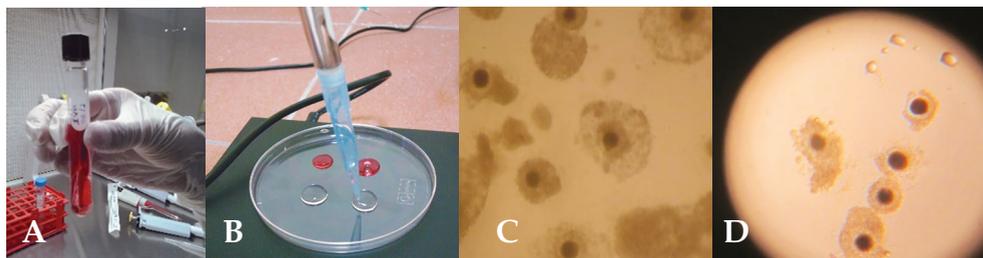


Figura 3. A. Medio de maduración de ovocitos. B. gotas con SOF HEPES[®] (transparentes) y gotas con medio de maduración para colocar los COCs aspirados. C. Ovocitos aspirados de alpaca en medio SOF HEPES. D. Ovocitos de alpaca seleccionados y colocados en medio de maduración.

Ruiz y Correa (2007), recuperaron COCS de alpaca y llama vía laparoscópica los cuales fueron madurados *in vitro* durante 27 y 30 horas respectivamente en un medio compuesto por TCM-199 suplementado con piruvato de Na 0.2 mM, sulfato de gentamicina 50 µg/ml, FSH 0,02 unidades/ml, estradiol 17-β 1 µg/ml y suero fetal bovino al 10%. Obtuvieron 75% y 100% de COCs maduros de llama y alpaca respectivamente.

Gamarra *et al.* (2008), realizaron la fecundación *in vitro* de COCs de alpaca, los cuales fueron madurados en TCM – 199 suplementado con 10% de suero fetal bovino más EFG, FSH, LH, estradiol y cisteamina por 30 horas a 38.5 °C, 5% de CO₂ y 90% de humedad. Los ovocitos seleccionados post-maduración fueron fecundados con espermatozoides epididimarios que fueron congelados utilizando una solución TRIS-Fructosa con 10% de glicerol. La dosis de inseminación fue 10x10⁶ de espermatozoides/gota de 100 ml de medio de fecundación que contiene 30 ovocitos, los resultados obtenidos fueron 27.1% de segmentación, 8% de mórula y 3% de blastocistos eclosionados.



Figura 4. A. Testículo de alpaca lavado con solución fisiológica atemperada. B. Separando el epidídimo del testículo. C. Epidídimo de alpaca separado del testículo. D. Recuperando espermatozoides desde el epidídimo seccionado en medio SPERM TALP.

Por otro lado, Huanca *et al.* (2009), evaluaron el efecto del tiempo de incubación sobre la maduración nuclear y determinaron la tasa de división de ovocitos de alpaca después de la fecundación *in vitro*. Los ovocitos fueron madurados *in vitro* por 30, 34 y 38 horas utilizando un medio de maduración compuesto por TCM-199 suplementado con 10% FCS (v:v), 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FSH, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ hCG, 0.2 mM piruvato de sodio, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ gentamicina y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Estradiol. Encontraron 18.9%, 42.9% y 65.8% de ovocitos maduros de alpaca que llegaron a Metafase II con 30, 34 y 38 horas de cultivo respectivamente. Las tasas de división de los ovocitos fecundados después de 30, 34 y 38 horas de maduración fueron 9.5%, 7.7% y 15.4% respectivamente. Estos resultados indican que se requieren 38 horas o más para la maduración y fertilización de ovocitos de alpaca.



Figura 5. A. En la base del tubo se observa el Pellet con espermatozoides de alpaca. B. El tubo está inclinado en la incubadora para la selección de espermatozoides por swim up. C. Inseminación *in vitro* de los ovocitos de alpaca. D. Colocando la placa Petri con los ovocitos de alpaca inseminados en la cámara de cultivo de embriones.

Santayana *et al.* (2012), realizaron un estudio con el objetivo de determinar el tiempo óptimo (24, 28 y 32 horas) de maduración nuclear *in vitro* de ovocitos de alpaca y evaluar la influencia de este sobre el desarrollo embrionario luego de la fecundación *in vitro*. Los resultados obtenidos muestran que el mayor porcentaje de maduración nuclear (ovocitos en Metafase II) fue alcanzado a las 32 horas de cultivo *in vitro* con un 65.1%, seguido por el de 28 horas con un 50.3% y finalmente el de 24 horas con un 46.3%. En cuanto al desarrollo embrionario, se observó que los porcentajes de segmentación (41.5%, 47.5% y 60.2%) y blastocisto (11.03, 14.19 y 17.02) aumentaron gradual y estadísticamente hacia el mayor tiempo de maduración, siendo el de 32 horas el tiempo con el mayor índice de desarrollo.

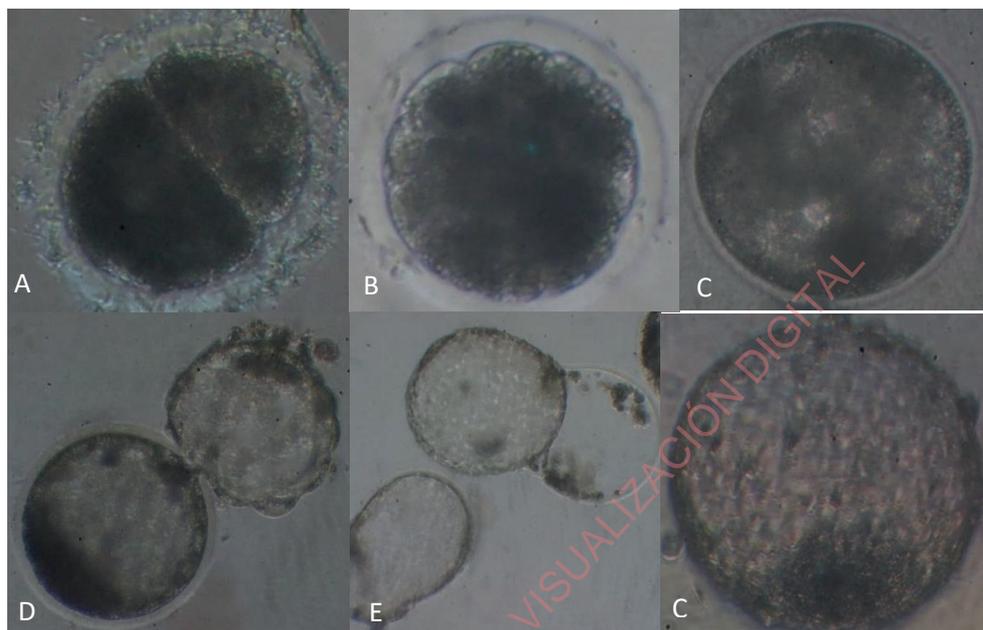


Figura 6. Desarrollo de un embrión in vitro de alpaca. A. Embrión de dos células. B. Mórula de alpaca. C. Blastocisto expandido de alpaca. D y E. Blastocistos de alpaca eclosionando. F. Blastocisto eclosionado de alpaca.

Ayuque *et al.* (2014), evaluaron el tiempo óptimo de maduración nuclear de ovocitos de llama (*Lama glama*) en el desarrollo de embriones producidos por fecundación *in vitro*, se recuperaron 1100 ovocitos de 178 ovarios (89 llamas) de animales que fueron beneficiados en el camal municipal de Huancavelica; se utilizaron 672 ovocitos de categoría I y II obtenidos por aspiración folicular de ovarios de llamas, fueron madurados en medio TCM-199 suplementado con HEPES 25 mM, piruvato de sodio 0.2 mM, sulfato de gentamicina 50 $\mu\text{g/ml}$, FSH 0.02 unidades/ml, estradiol 17- β 1 $\mu\text{g/ml}$ y suero fetal bovino al 10%, e incubados a 38.5°C en una atmósfera de aire estéril con 5% CO_2 , 5% O_2 y 90% N_2 , por espacio de 28, 36 y 42 horas. Transcurrido estos tiempos, los ovocitos fueron retirados del medio y sumergidos en una solución de hialuronidasa al 0.1% para ser separados de las células del cúmulo. Los ovocitos fueron fijados en una solución de metanol ácido acético (3:1) y teñidos con orceína acética al 1% para evaluar el estado de maduración nuclear (vesícula germinal VG, vesícula germinal rota-GVBD, metafase I-MI, metafase II-MII). En el siguiente experimento, se realizó la fecundación *in vitro* y se evaluó el desarrollo embrionario, para lo cual se

procedió a madurar los ovocitos del mismo modo que en el ensayo anterior, conservando los tiempos de 28, 36 y 42 horas. Se recuperaron espermatozoides epididimarios en medio Sperm TALP para luego ser lavados y seleccionados mediante la técnica de Swim-up, se utilizó una concentración promedio de $1.5 - 2 \times 10^6$ espermatozoides/ml para inseminar los ovocitos. Transcurridas las 18h de fecundación, los presuntos cigotos fueron transferidos al medio SOF-IVC e incubados por 7 días a 38.5°C , en una atmósfera de aire estéril con 5% CO_2 y 90% de humedad. Los resultados obtenidos muestran que el mayor porcentaje de maduración nuclear (ovocitos en estadio en MII) está entre 36 y 42 horas ($70.17 \pm 4.21\%$ y $70.53 \pm 3.72\%$) respectivamente, seguida de 28 horas ($49.14 \pm 2.79\%$) con diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). Por otra parte, en cuanto a los resultados del desarrollo embrionario, se obtuvo los porcentajes de segmentación, mórula y blastocistos ($51.00 \pm 3.31\%$, $71.47 \pm 2.49\%$ y $11.64 \pm 1.30\%$) respectivamente para 36 horas, el porcentaje de segmentación, mórula y blastocisto ($49.55 \pm 3.56\%$, $76.69 \pm 2.90\%$ y $12.51 \pm 2.22\%$) respectivamente para 42 horas, sin encontrarse diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p > 0.05$). Se concluye que el tiempo óptimo que requiere los ovocitos de llama para llegar a la madurez nuclear (metafase II) está entre 36 y 42 horas, encontrando la misma capacidad de desarrollo embrionario *in vitro* en este mismo periodo de tiempo, bajo las condiciones del presente estudio.

Ruiz y Artica (2021), evaluaron el tiempo de maduración de ovocitos de alpaca. Los ovocitos fueron madurados *in vitro* por 26, 30, 34, 38 y 42 horas. En un primer experimento, transcurrido el tiempo de maduración, los ovocitos seleccionados para la fijación y tinción se introdujeron en una solución de hialuronidasa 1 mg/ml por 1 minuto, pasado este tiempo se aspiraron repetidamente con una micropipeta de 20 μl con el objeto de remover completamente las células del cúmulo adheridas a la zona pelúcida. Luego, los ovocitos fueron expuestos a una solución de Carnoy a 4°C (metanol absoluto: ácido acético glacial, 3:1) durante 24 horas para su fijación. La morfología nuclear de los ovocitos teñidos se examinó bajo un microscopio óptico, con objetivo de 40X, para luego ser clasificados en 4 categorías en función a su estadio nuclear: Vesícula Germinal (VG), Vesícula Germinal Rota (GVBD), Metafase I (M-I) y Metafase II (MII). En un segundo experimento, después de los periodos de maduración de 26, 30, 34, 38 y 42 horas los ovocitos fueron inseminados *in vitro* con 3×10^6 espermatozoides/ml. Los espermatozoides y los ovocitos se mantuvieron juntos en la incubadora durante 18 horas a 38.5°C , 90% de humedad y 5% de CO_2 , y luego los ovocitos se cultivaron por 7 días en gotas de 50 μl de Medio Fluido Oviductal Sintético (SOF-IVC) su-

plementado con 3 mg/ml de BSA en una incubadora a 38.5°C, 90% de humedad y 5% de CO₂. Los resultados encontrados en el experimento 1 indican que para 26, 30, 34, 38 y 42 horas se encontró 25%, 33.3%, 33.3%, 34.2% y 43.3% de ovocitos en Metafase II respectivamente. En el experimento 2 se encontró 48.4%, 38.8%, 35.6%, 33.2% y 26.8% de división a las 48 horas de la FIV; y 35.5%, 14.8%, 12.4%, 6.0% y 2.8% de blastocistos a los 8 días de la FIV, respectivamente. Si bien en el experimento 1 se encontró mayor cantidad de ovocitos en Metafase II con el tratamiento de 42 horas de MIV, en el experimento 2 se encontró menor división y blastocistos en el tratamiento con 42 horas de MIV, esto se puede explicar porque los ovocitos que ya maduraron en tiempos previos (26, 30, 34 y 38 horas) ya han envejecido al llegar a las 42 horas de MIV y tienen menos probabilidades de desarrollar un embrión luego de la inseminación *in vitro*.

Medios para el cultivo *in vitro* de embriones de alpacas

En camélidos sudamericanos se han utilizado diferentes medios para el cultivo de embriones como son: SOF + 0.6% BSA (Machicado *et al.*, 2009; Berland *et al.*, 2011), SOF-IVC (Mendoza *et al.*, 2008; Huamán *et al.*, 2011; Santayana *et al.*, 2012), SOFaa (Gamarra *et al.*, 2008; Conde *et al.*, 2008, Trasorras *et al.*, 2011, 2014), TCM-199 (Del Campo *et al.*, 1994; Gómez *et al.*, 2002; Ratto *et al.*, 2007; Huanca *et al.*, 2009), KSOM (Condori *et al.*, 2010; Huanca *et al.*, 2010, Arriaga *et al.*, 2014; Huanca *et al.*, 2014), DMEM (Trasorras *et al.*, 2011), CR1aa (Sansinena, 2007), en un reciente estudio Ruiz *et al.*, (2021) compararon SOF – IVC, CR1aa, TCM y KSOM para el cultivo *in vitro* de embriones de alpaca, encontraron que SOF-IVC y KSOM obtuvieron mejores tasas de desarrollo embrionario.

Machicado *et al.* (2009), recuperaron COCs por laparotomía en llamas superovuladas con eCG, los COCs fueron madurados *in vitro* en TCM-199 con BSA. Posteriormente, los ovocitos fueron inseminados con semen fresco tratado con proteasa. Los embriones fueron cultivados en SOF suplementado con 0.6% de albúmina de suero bovino. Obtuvieron 60% de ovocitos fecundados. Al sexto día se obtuvo 29.4% de mórulas tempranas con un promedio de 8 blastómeros, 23.8% de mórulas con membrana irregular y 16 blastómeros, 29.4% de blastocistos tempranos provistos de zona pelúcida regular y delgada con numerosos blastómeros y 17.4% de blastocistos de forma circular, membrana regular con blastómeros difíciles de contar y sin espacios entre células.

Berland *et al.* (2011), evaluaron la respuesta ovárica, morfología y competencia de COCs colectados por aspiración folicular guiada por ultrasonografía en llamas tratadas con FSH o eCG. Los COCs expandidos colectados en ambos tratamientos fueron fecundados *in vitro* usando espermatozoides epididimarios. Luego los presuntos cigotos fueron co-cultivados con células de granulosa de llama en SOF suplementado con 0.6% de albúmina de suero bovino a 39 °C, 5% CO₂, 5% O₂ y 90% de N₂ por 7 días. El porcentaje de división obtenido al día 2 fue de 65.3% y 63.1%, mórulas en el día 5 fue de 46.2% y 42.5% y blastocistos en el día 7 fue de 23.1% y 20.5% no se encontraron diferencias estadísticas (P>0.05) entre las llamas tratadas con FSH y eCG respectivamente. Concluyendo que los COCs expandidos recuperados por aspiración folicular transvaginal de llamas superovuladas con FSH o eCG pueden ser utilizados directamente para la FIV.

Conde *et al.* (2008), compararon la producción de embriones de llama por dos técnicas: FIV (fecundación *in vitro*) e ICSI (Intracytoplasmic sperm injection). Después de 24 horas de la FIV o ICSI, los presumibles embriones fueron cultivados en medio SOF (Tervit *et al.*, 1972) suplementado con 1 μM glutamina, 2% (v/v) aminoácidos esenciales, 1% aminoácidos no esenciales y 8 mg/ml BSA (Gardner *et al.*, 1994). Las tasas de división y de desarrollo embrionario fueron registradas a las 48 horas y a los 6-7 días del inicio del cultivo *in vitro*.

Trasorras *et al.*, (2014) evaluaron la competencia del desarrollo y tasa de preñez de blastocistos eclosionados de llamas producidos *in vitro* usando gametos de animales vivos y dos diferentes condiciones de cultivo. Los ovocitos fueron colectados por aspiración folicular guiada por ultrasonografía y el semen por electroeyaculación. Después de 24 horas de la fecundación, los ovocitos fecundados fueron colocados en medio SOFaa suplementado con suero fetal bovino y divididos en dos tratamientos: (T1) 6 días de cultivo en el mismo medio y (T2): renovando el medio de cultivo cada 48 horas. En (T1): la tasa de blastocistos fue 36% (10/28) y de blastocistos eclosionados 28% (8/28), mientras que en (T2); la tasa de blastocistos fue de 34% (12/35) y de blastocistos eclosionados fue de 20% (7/35), sin diferencias estadísticas. No se obtuvieron preñeces en T1 (0/8) luego de la transferencia de los blastocistos mientras que en T2 (1/7) se obtuvo una preñez. Después de 42 días de la transferencia de los embriones la preñez se perdió. Este estudio representa el primer reporte de preñez de una llama con un embrión producido *in vitro* utilizando gametos de animales vivos.

Gómez *et al.* (2002), maduraron *in vitro* durante 26 horas ovocitos de alpaca recuperados por laparotomía ventral los cuales fueron fecundados *in vitro* con

semen de epidídimo de llamas macho beneficiadas. Los 5 COCs que fueron fecundados y cultivados *in vitro* en medio TCM – 199 desarrollaron hasta mórula a los 6 días de evaluación, ninguno continuó el desarrollo hasta el estadio de blastocisto. Este es el primer reporte de la producción *in vitro* de embriones híbridos de alpaca - llama.

Condori *et al.* (2010), evaluaron el efecto de la adición de FSH en el medio de maduración sobre la maduración nuclear y tasa de división. Los tratamientos fueron T1 (control): FSH por 42 h, T2: 21 h con FSH + 21h sin FSH, T3: 21 h sin FSH + 21 H con FSH. Transcurridas las 42 horas de maduración, parte de los ovocitos fueron fijados en etanol: ácido acético (3:1) y luego teñidos con orceína al 1% para evaluar los estados de maduración alcanzados. El resto de ovocitos fue fecundado *in vitro* con espermatozoides del epidídimo. Los posibles cigotos fueron cultivados en KSOM suplementado con 1 mM Glutamina, 0.3 mM piruvato de Na, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Gentamicina, EDTA, aminoácidos esenciales y no esenciales y BSA por 3 días y cultivados en medio SOF por 7 días. Los ovocitos que alcanzaron la metafase II fueron 64.9 ± 8.1 , 49.2 ± 9.4 y $53.8 \pm 7.5\%$ para T1, T2 y T3 respectivamente. Las tasas de división fueron 39.1%, 36.3% y 33.1% y las tasas de blastocistos fueron 13.6%, 16.1% y 14.5% para T1, T2 y T3 respectivamente. Los resultados sugieren que el momento de la adición de FSH no tiene efecto sobre el medio de maduración y tasa de división de ovocitos de alpaca.

Huanca *et al.* (2010), evaluaron la respuesta folicular ovárica, la tasa de colección de COCs, fecundación y cultivo de COCs de alpacas después del tratamiento con 2 diferentes gonadotropinas para la superovulación, T1: (n= 8) 200 mg de FSH dividido en 3 días, más una única dosis de 1000 UI de hCG 24 horas después del último tratamiento de FSH; T2: (n= 10) 750 UI eCG en única dosis más una dosis de 1000 UI de hCG al tercer día después del tratamiento con eCG (día 0 = inicio del tratamiento superovulatorio). Al día 20 – 22 después del tratamiento con hCG los ovarios fueron quirúrgicamente expuestos y los COCs fueron aspirados desde folículos mayores a 6 mm. Los COCs colectados fueron madurados *in vitro* por 24 horas y luego fueron fecundados con espermatozoides epididimarios. Los presuntos cigotos fueron cultivados en medio KSOM suplementado con 1 mM Glutamina, 0.3 mM piruvato de Na, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Gentamicina, EDTA, aminoácidos esenciales y no esenciales y BSA por 3 días y cultivados en medio SOF por 7 días. El número de folículos mayores a 6 mm presentes en la superficie ovárica no difieren al momento de colección de COCs (19.3 ± 5.7 y 21.5 ± 7.3), y el número de COCs colectados fue de 16.7 ± 5.3 y

17.3 ± 6.6 para FSH y eCG respectivamente. La tasa de división fue 45.2% y 42.1% a las 72 h de cultivo y la tasa de blastocistos el día 7 fue de 22.2% y 19.3% para FSH y eCG respectivamente, sin diferencias entre tratamientos. En conclusión, los tratamientos con FSH y eCG no difieren en la respuesta ovárica, tasas de colección de COCs, fecundación y cultivo de COCs. Ambas gonadotropinas pueden ser usados en protocolos de IVF en alpacas.

Trasorras *et al.* (2011), fecundaron *in vitro* ovocitos de llama usando espermatozoides seleccionados con Androcoll-E y evaluaron la eficiencia del medio DMEM-F12 para el desarrollo *in vitro* de embriones de llama. Doce hembras adultas fueron superovuladas y usadas como donantes de ovocitos. El tratamiento se realizó con 1500 UI de eCG y 5 días después recibieron una dosis única de buserelina y 20 horas después se realizó la aspiración folicular por laparotomía. El semen de los machos llama fue colectado por electroeyaculación. Los eyaculados fueron procesados con una solución de colagenasa 0.1% y se utilizó una columna de Androcoll-ETM para enriquecer la muestra con espermatozoides normales y móviles. Se obtuvieron 69 COCs de 79 folículos aspirados (87% de recuperación). Sólo se utilizaron COC's en estado expandido (n=67), se colocaron en microgotas de 40 µl de medio FERT-TALP en grupos de 1-5 y se inseminaron con una concentración de 20 x 10⁶ espermatozoides vivos/ml. Luego de 24 horas, los presuntos cigotos se colocaron al azar en dos medios de cultivo: SOF (control; n=34) y DMEM F12 (n=33) e incubados durante 6 días en estufa gaseada (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂) a 38.0°C y atmósfera humidificada. En el medio SOF se obtuvo un 20% de blastocistos (7/34), de los cuales 3 se encontraban eclosionados, 2 expandidos y 1 blastocisto temprano. En el medio DMEM se obtuvo un 15% de blastocistos (5/33), todos ellos en estado expandido. Estos resultados indican que es posible seleccionar espermatozoides de buena calidad y utilizarlos en la fecundación *in vitro* con Androcoll-E y producir blastocistos de llama en medio DMEM.

Ruiz *et al.* (2021), evaluaron 4 medios para el cultivo de embriones de alpaca producidos por fecundación *in vitro*. Los ovocitos fueron madurados *in vitro* por 26 horas y luego co-cultivados con 3 x 10⁶ espermatozoides /ml por 18 -20 horas en una incubadora bajo una atmósfera con 5% de CO₂ y 38.5 °C. Los tratamientos fueron T1 (n = 137): TCM 199 + 10% de suero fetal bovino, T2 (n = 85): CR1aa + 3 mg de albúmina de suero bovino, T3 (n=110): medio KSOM + 3 mg de albúmina de suero bovino y T4 (n = 66): SOF IVC + 10% de suero fetal bovino. Para la variable división (embriones de dos células) no se encontraron diferencias estadísticas entre TCM 199 + 10% de suero fetal bovino (28% ± 0.12), CR1aa +

3 mg de albúmina de suero bovino ($44\% \pm 0.24$), KSOM + 3 mg de albúmina de suero bovino ($38\% \pm 0.19$) y SOF IVC + 10% de suero fetal bovino ($50\% \pm 0.20$). En mórulas, SOF IVC + 10% de suero fetal bovino ($35\% \pm 0.21$), TCM 199 + 10% de suero fetal bovino ($23\% \pm 0.09$) y KSOM + 3 mg de albúmina de suero bovino ($27\% \pm 0.15$) superaron estadísticamente a CR1aa + 3 mg de albúmina de suero bovino ($7\% \pm 0.09$). Finalmente se obtuvo mayores tasas de blastocistos con SOF IVC + 10% de suero fetal bovino ($24\% \pm 0.12$) y KSOM + 3 mg de albúmina de suero bovino ($20\% \pm 0.18$) que con TCM 199 + 10% de suero fetal bovino ($9\% \pm 0.03$) y CR1aa + 3 mg de albúmina de suero bovino ($3\% \pm 0.06$). En conclusión, SOF IVC y KSOM fueron los mejores medios para el cultivo de embriones de alpaca producidos por fecundación *in vitro*.

Uso de agentes capacitantes

Existen estudios en camélidos sudamericanos en los cuales se ha utilizado una combinación de agentes capacitantes que es muy utilizada en la capacitación de espermatozoides de vacunos, Del Campo *et al.* (1994) han utilizado esta combinación compuesta por PHE (Penicilamina, Hipotaurina, Epinefrina) y heparina para la capacitación de espermatozoides de llama, igualmente existen reportes de investigación que han utilizado esta combinación para la capacitación de espermatozoides de alpaca (Gamarra *et al.*, 2008; Arriaga *et al.*, 2014; Huanca *et al.*, 2014). Por otro lado, Ratto *et al.*, (2007) y Berland *et al.*, (2011) han utilizado sólo heparina como agente capacitante de espermatozoides de llama. Sin embargo, existen autores que no utilizan agentes capacitantes (Mellisho *et al.*, 2014; Landeo *et al.*, 2016; Landeo *et al.*, 2017; Ruiz *et al.*, 2017; Mamani - Mango *et al.*, 2019) para la fecundación *in vitro* de ovocitos de alpacas. Ruiz y Artica (2021), han comparado el uso de Heparina y Cafeína como agentes capacitantes de espermatozoides de alpaca y no encontraron diferencias estadísticas en las variables evaluadas del desarrollo embrionario *in vitro*.

Arriaga *et al.* (2014), evaluaron el efecto de la temperatura ($12-15^{\circ}\text{C}$ y $22-25^{\circ}\text{C}$) y el tiempo de almacenamiento (0 y 16 horas) de ovarios de alpacas sobre la tasa de maduración y división post fecundación *in vitro*. Los ovarios fueron distribuidos al azar en los tratamientos control (0 h), T1 (16 h a $12-15^{\circ}\text{C}$) y T2 (16 h a $22-25^{\circ}\text{C}$). Los ovocitos recuperados fueron madurados en medio TCM 199 por 40 h bajo condiciones de $5\% \text{CO}_2$ y 39°C . Para la fecundación *in vitro* se colocaron 2 μl de suspensión de espermatozoides en cada microgota con los ovocitos maduros y se añadieron 2 μl de heparina al 2% y 2 μl de PHE (2

mM Penicilamina, 1 mM Hipotaurina y 250 mM Epinefrina). Se realizó el co-cultivo en una estufa bajo condiciones de 39 °C con 5% de CO₂, 20% de O₂ y humedad relativa alta durante 18 horas. Luego de la fecundación, los presuntos cigotos fueron colocados en medio de cultivo KSOM 72 h post fecundación *in vitro* y luego transferidos a medio SOF. Se obtuvo una tasa de blastocistos de 33.3%, 14.2% y 20.6% para los grupos Control, T1 y T2, respectivamente ($p < 0.05$, excepto entre la tasa de blastocistos del T1 y T2). Los resultados sugieren que el almacenamiento de ovarios de alpaca a 22-25 °C por 16 h (T2) permite mantener la calidad de los ovocitos y obtener una mayor tasa de maduración y de división post fecundación *in vitro*.

Huanca *et al.* (2014), evaluaron el efecto del tiempo de cultivo sobre la tasa de maduración nuclear y tasa de división post fecundación a 72 horas de ovocitos de alpacas. Los COCs recuperados de ovarios de alpacas fueron distribuidos en dos experimentos: Experimento 1: 502 ovocitos fueron distribuidos en cuatro tiempos de maduración (30, 34, 38 y 42 horas) y fijados en solución de etanol y ácido acético (3:1). Los ovocitos fueron colocados en portaobjetos, teñidos con 1% de orceína y examinados bajo un microscopio a 400x para determinar la maduración nuclear. Experimento 2: 533 ovocitos fueron cultivados bajo las mismas condiciones del experimento 1 y fecundados con espermatozoides obtenidos de epidídimos. A cada gota del medio de fecundación con ovocitos, se agregó 2 µl de la suspensión de espermatozoides, 2 µl de heparina (1 mg/ml) y 2 µl de PHE (2 mM Penicilamina, 1 mM Hipotaurina y 250 mM Epinefrina). Los gametos fueron co-cultivados por 18 horas a 39 °C, 5% de CO₂ y bajo condiciones de máxima humedad. Posteriormente los presuntos cigotos fueron cultivados en KSOM suplementado con 10% de SFB, 2 mM de piruvato de sodio y 50 µg/mL gentamicina, y evaluados a las 72 horas. En el Experimento 1 se obtuvo el 26.3±5.4, 52.6±6.7, 68.5±10.6 y 75.3±11.9% de ovocitos en Metafase-II para 30, 34, 38 y 42 h de cultivo, respectivamente, con diferencia estadística entre 30 y 34 h respecto a 38 y 42 h ($p < 0.05$). En el Experimento 2, la tasa de división fue 9.5±4.8, 8.1±5.8, 15.6±9.2 y 19.8±8.0% para 30, 34, 38 y 42 h, sin diferencia estadística entre grupos. Los resultados sugieren que los ovocitos de alpaca requieren de 38 a 42 horas de maduración para obtener estadios de Metafase-II.

Ratto *et al.* (2007) realizaron un estudio para comparar la respuesta folicular ovárica, la tasa de colección de COCs, y el estado de maduración de los COCs colectados en alpacas con dos diferentes tratamientos superovulatorios. Los tratamientos fueron, T1: 200 mg de FSH aplicado dos veces/día por 3 días

consecutivos más una dosis de 1000 UI de hCG 24 horas después del último tratamiento con FSH; T2: 1200 UI de eCG más 1000 UI de hCG 3 días después del tratamiento con eCG (día 0 = inicio del tratamiento superovulatorio). Después de 20 – 24 horas post tratamiento de hCG, los ovarios fueron expuestos quirúrgicamente y se realizó la aspiración de los COCs desde folículos con un tamaño mínimo de 6 mm. Los tratamientos con FSH y eCG no difieren con respecto al número de folículos mayores a 6 mm presentes al momento de la colección de los COCs, el número de los COCs colectados o la tasa de colección por folículo aspirado. Asimismo, no se encontraron diferencias entre los tratamientos con FSH y eCG en el número de COCs colectados por alpaca, el número de COCs expandidos en Metafase II y en el número de COCs compactos con más de 3 capas de células del cúmulo. Para ver la competencia de los ovocitos colectados, 5 COCs expandidos de alpaca fueron fecundados *in vitro* con espermatozoides de llama en medio Fert-TALP (Bavister y Yanagimachi, 1977) suplementado con 6 mg/ml de BSA libre de ácidos grasos y 10 µg/ml de heparina hasta una concentración final de 1×10^6 espermatozoides/ml. Los presuntos embriones fueron cultivados y desarrollaron a dos células y mórula al segundo y séptimo día después de la fecundación *in vitro*, respectivamente. En resumen, los tratamientos con FSH y eCG fueron igualmente efectivos para la súper estimulación ovárica y colección de COCs de alpacas.

Mellisho *et al.* (2014), evaluaron el efecto de dos tratamientos para la selección de espermatozoides (swim-up y washing) antes de la fecundación *in vitro* sobre la tasa de división. Los espermatozoides fueron obtenidos por slicing de la cola del epidídimo de 8 alpacas beneficiadas, diluidos en TRIS - glicerol-yema de huevo y congelados con el método de congelamiento lento. Pajillas de semen congelado de cada macho fueron descongeladas a 37°C por 15 segundos y, una vez descongeladas se evaluó la motilidad progresiva ($32 \pm 8.6\%$) y la concentración espermática ($66.5 \pm 24.4 \times 10^6$ espermatozoides ml^{-1}) post descongelamiento. El método de selección por swim up se realizó por centrifugación a $1077 \times g$ durante 5 min, los espermatozoides se asentaron en un tubo inclinado con medio de fecundación (sin agente capacitante) durante 60 minutos, después de lo cual se recuperaron 100 µL de la superficie para su uso en FIV. El método washing consistió en el lavado repetido (dos veces) de espermatozoides en medio de lavado y en medio de fecundación por centrifugación a $1077 \times g$ durante 5 y 3 min, respectivamente, y se recuperó 50 µL del fondo del tubo para su uso en FIV. Los espermatozoides seleccionados por el método de swim up o washing tuvieron características similares de motilidad progresiva (18%

y 23%); sin embargo, la concentración fue más alta en el método washing vs swim up (52 vs 14×10^6 espermatozoides mL^{-1} , respectivamente). COCs fueron recuperados desde 278 ovarios de alpacas beneficiadas y clasificados (Grado 1 y 2) para la maduración *in vitro* (38.5°C a $5\% \text{CO}_2$ al aire por 27 horas en $50 \mu\text{L}$ de 10 COCs por gota). Un total de 839 ovocitos fueron cultivados por 27 h en medio de maduración fueron parcialmente separados de las células del cumulus por pipeteo suave. Suspensiones de espermatozoides en medio Fert-TALP ($5 \mu\text{L}$) de cada tratamiento fueron añadidos a cada gota de fecundación con 10 ovocitos por gota de $45 \mu\text{L}$ obteniendo una concentración final de 10×10^6 espermatozoides mL^{-1} y se cultivaron durante 72 h hasta su evaluación. La tasa de división no mostró diferencias estadísticas entre ambos métodos (37% vs 35%) para swim up y washing respectivamente.

Landeo *et al.* (2016), transfirieron embriones de alpaca y llama obtenidos por fecundación *in vitro* en llamas receptoras y evaluaron las tasas de preñez y natalidad. Los COCs fueron recuperados por aspiración folicular utilizando una jeringa de 5 ml y los COCS con más de 3 capas de células de la granulosa fueron madurados *in vitro* durante 30 y 36 horas para ovocitos de alpaca y llama respectivamente. Después de la maduración los COCs fueron colocados en FERT – TALP 30 minutos antes de la inseminación *in vitro* con espermatozoides de epidídimo de alpaca y llama según corresponda, los espermatozoides se seleccionaron mediante el método de swim up centrifugando dos veces en 2 ml de SPERM – TALP suplementado con 6mg ml^{-1} de BSA libre de grasas, en una incubadora con $5\% \text{CO}_2$ al aire a 39°C por 45 min, los ovocitos se incubaron conjuntamente con espermatozoides a una concentración de $3 \times 10^6 \text{mL}^{-1}$ durante 18 a 20 h a 39°C con $5\% \text{CO}_2$ al aire. La FIV se realizó el día de la inducción de la ovulación de las receptoras. Un grupo de 15 blastocistos del día 8 de desarrollo *in vitro* fueron transferidos en el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo de 15 llamas receptoras sincronizadas con un dispositivo intravaginal con progesterona durante 8 días. 9 blastocistos de alpaca y 6 de llama fueron transferidos. La evaluación de preñez se realizó a los 45 días después de la transferencia de embriones. Se obtuvieron tasas de preñez de 33.3% (3/9) y 50% (3/6) en llamas transferidas con embriones de alpaca y llama respectivamente; y tasa de nacimiento de 0.0% (0/9) y 16.7% (1/6) para embriones de alpaca y llama respectivamente. Un feto alpaca y dos fetos de llama fueron abortados entre los 7 y 10 meses de gestación, y solamente una llama logró terminar la gestación satisfactoriamente, *produciéndose* el primer nacimiento del Mundo de una cría llama por FIV en camélidos sudamericanos, demostrándose que es posible obtener crías vivas en estas especies usando esta biotecnología.

Landeo *et al.* (2017), evaluaron la competencia de desarrollo de embriones FIV de alpaca producidos por bisección embrionaria. 33 embriones de calidad buena y excelente en diferentes estados: de dos células (n=6), de 8 células (n=15) y mórulas (n=12) producidos por FIV fueron bipartidos obteniéndose dos mitades relativamente iguales. Estos embriones fueron tratados con proteasa durante dos minutos para remover la zona pelúcida y luego cortados con ayuda de una cuchilla microquirúrgica. Se obtuvieron 66 demi-embryones después de la bisección embrionaria y todos fueron cultivados *in vitro*. 25% (3/12) de embriones bipartidos en dos células y 100% (30/30) de aquellos embriones bipartidos en 8 células desarrollaron hasta el estado de mórula; y 80% (18/24) de embriones bipartidos en el estado de mórula desarrollaron hasta el estado de blastocisto. En el grupo control de embriones no manipulados se obtuvieron 42% (25/60), 35% (21/60), 32% (19/60) y 28% (17/60) de división, mórula, blastocisto y blastocisto eclosionado respectivamente. En conclusión, embriones de alpacas clonados por bipartición en estados menores a 8 células no producen blastocistos. La etapa más temprana para producir blastocistos a partir de embriones de alpaca producidos por bisección embrionaria es la etapa de mórula.

Ruiz *et al.* (2017), evaluaron el efecto del tiempo de maduración *in vitro*, selección espermática y oxígeno tensión sobre el desarrollo de embriones de alpaca. En el experimento I, COCs fueron madurados *in vitro* en TCM – 199 por 24, 28 y 32 horas a 38.5 °C, alta humedad y 5% CO₂ al aire. Los COCs fueron fecundados *in vitro* con espermatozoides de epidídimo (sin agentes capacitantes) y cultivados en SOFaa a 38.5°C, gran humedad y 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂ por 7 días. En el experimento II, se usó un diseño factorial de 2 x 2 para determinar el efecto de selección espermática (Swim up vs Percoll) y tensión de oxígeno (20% vs 5%) durante el cultivo de embriones y su interacción con el desarrollo embrionario. Los COCs fueron madurados *in vitro* durante 32 h a 38.5°C, gran humedad y 5% CO₂ al aire y fueron inseminados *in vitro* con espermatozoides procesados por swim up o Percoll (sin agentes capacitantes). Los cigotos fueron cultivados en SOFaa más células del cúmulo a 38.5°C bajo 20% o 5% de tensión de O₂ y gran humedad por 7 días. Los tratamientos fueron: swim up + 20% O₂, swim up + 5% O₂, Percoll + 20% O₂ y Percoll + 5% O₂. En el experimento I, la proporción de ovocitos que alcanzaron la metafase II fue mayor después de 32 h de maduración *in vitro*. Asimismo la tasa de blastocistos fue mayor en los COCs madurados por 32 horas. En el experimento II, la tasa de blastocistos (26.03% ± 4.7; 27.7% ± 4.3; 29.7% ± 3.8 y 27.6% ± 4.2% para swim up + 20% O₂, swim up + 5% O₂, Percoll + 20% O₂ o Percoll + 5% O₂, respectivamente) no fue afectada por el método de selección de espermatozoides, tensión de oxígeno o su interacción.

Mamani – Mango *et al.* (2019), evaluaron el efecto de dos dilutores y dos tasas de congelamiento sobre la calidad post descongelamiento de espermatozoides recuperados de epidídimos de alpaca con dos métodos (flushing and mincing) y evaluar la capacidad de FIV de espermatozoides congelados seleccionados con dos métodos diferentes de selección (lavado y swim up). Las muestras de espermatozoides fueron procesadas con los dilutores TRIS-yema de huevo o Bioxcell y congelados con congelación lenta o congelación rápida. Los ovocitos fueron co-incubados con espermatozoides por 72 horas y se registraron las tasas de división. Los resultados indican que el método de recuperación de espermatozoides no influye en la calidad de los espermatozoides. Sin embargo, la recuperación total de espermatozoides fue significativamente más baja por el método del lavado que en el método de picado. La calidad de los espermatozoides fue influenciada por el dilutor de congelamiento (23.3% vs 33.2%) y la tasa de congelación (20.9% vs 35.7%). Cuando comparamos diferentes métodos de selección de espermatozoides para FIV, no se observaron diferencias en la tasa de división excepto por el hecho de que la concentración de espermatozoides del método de swim up (20.6%) fue significativamente más bajo que la obtenida en el método de lavado (78.7%). La técnica de recuperación de espermatozoides no afectó la calidad de los espermatozoides y el método de congelamiento rápido fue más efectivo para la criopreservación de espermatozoides de alpaca.

Ruiz y Artica (2021), compararon la eficiencia de la cafeína y la heparina en la capacitación de espermatozoides de alpaca previo a la fecundación *in vitro* de ovocitos de alpaca. En ambos casos tanto para la capacitación con cafeína y con heparina los espermatozoides móviles fueron seleccionados por Swim up (30 minutos) en medio Fert-Talp suplementado con 100 µg/ml de cafeína, 25 µM de piruvato de sodio, 50 µg/ml de sulfato de gentamicina y con 6mg/ml de BSA libre de grasa (tratamiento 1: T1); o 20 µg/ml de heparina, 25 µM de piruvato de sodio, 50 µg/ml de sulfato de gentamicina y con 6mg/ml de BSA libre de grasa (tratamiento 2: T2); y con 6mg/ml de BSA libre de grasa, 25 µM de piruvato de sodio y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (grupo control:T0). Los espermatozoides capacitados y los del grupo control fueron usados para inseminar ovocitos previamente madurados *in vitro* por 26 horas. Después de 18 horas de co-cultivo de los espermatozoides y los ovocitos en medio FERT-TALP, los presuntos cigotos fueron colocados en medio SOF IVC y cultivados por 8 días. Los resultados obtenidos para división fueron 45.8 ± 11.7 , 44.3 ± 11.9 , 44.7 ± 13.8 para cafeína, heparina y grupo control respectivamente, para mórulas se obtuvo 36.5 ± 9.5 , 35.1 ± 6.1 y 35.5 ± 11.4 para cafeína, heparina y grupo control respectivamente, finalmente para blastocistos se obtuvo 32.1 ± 9.1 , 31.1 ± 7.3 y

24.4 ± 6.6. No se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos en las 3 variables evaluadas. En conclusión, en las condiciones en que se realizó este estudio no es necesario la capacitación de espermatozoides epididimarios de alpaca.

Co-cultivo de células y embriones

Se cree que el co-cultivo de embriones con células favorece el desarrollo embrionario. En camélidos sudamericanos existen pocos reportes del co-cultivo de embriones con células. Del Campo *et al.* (1994), utilizaron células de oviducto de llama para el co-cultivo de embriones de llama. Por otro lado, Ratto *et al.* (2007) co-cultivaron embriones híbridos de llama por alpaca con células epiteliales del oviducto de bovino. Berland *et al.* (2011), utilizaron células del cúmulo para el co-cultivo de embriones de llama producidos por fecundación *in vitro*. En alpacas, Manrique y Taype (2017), encontraron mayor tasa de blastocistos cuando cultivaron embriones FIV de alpacas con células del oviducto que con el co – cultivo con células de la granulosa.

Del Campo *et al.* (1994), fecundaron *in vitro* ovocitos de llama (*Lama glama*) usando espermatozoides de epidídimo y los embriones obtenidos se co-cultivaron con células del oviducto, el objetivo fue determinar la factibilidad de la maduración y fecundación *in vitro*, y sistemas de co-cultivo de embriones de llama con células del oviducto. De un total de 1324 complejos ovocito cúmulo (COCs) recuperados de llamas beneficiadas, 972 fueron cultivados en gotas de 50 ul de medio TCM-199 con 10% de suero bovino inactivado por calor (DBS) y hormonas por 30h. Después de la maduración, los ovocitos fueron colocados aleatoriamente dentro de 4 grupos en un diseño factorial de 2x2; T1: ovocitos con células del cúmulo, 2ug/ml de heparina; T2: ovocitos con células del cúmulo, 5ug/ml de heparina; T3: ovocitos desnudos, 2ug/ml de heparina; T4: ovocitos desnudos, 5ug/ml de heparina. Los ovocitos desnudos fueron obtenidos para los T3 y T4 por agitación en vortex. Los epidídimos también fueron colectados post beneficio de llamas macho y los espermatozoides frescos (para cada réplica) fueron obtenidos cortando la cola del epidídimo con hoja de bisturí. Un total de 721 ovocitos fueron inseminados con espermatozoides epididimarios en gotas de 50 ul de medio FERT-TALP. Después de 18h de la inseminación *in vitro*, 234 ovocitos fueron colocados en co-cultivo con células epiteliales del oviducto de llama (LLOEC) en TCM-199 por 9 días. Todos los cultivos fueron hechos a 38.5°C bajo 5% de CO₂ con alta humedad. Las tasas de fecundación y desarrollo en co-

cultivo fueron evaluados y comparados. De 192 ovocitos examinados por signos de fecundación, 56 (29.2%) fueron penetrados por espermatozoide con 57.1% (32/56) de los ovocitos penetrados tuvieron un pronúcleo masculino y femenino. No se encontraron diferencias para los tratamientos en la fecundación total. Sin embargo, la frecuencia de ovocitos fecundados normalmente tiende a ser mayor en los ovocitos desnudos 67.7% (21/31) que en los ovocitos inseminados con células del cúmulo 44.0% (11/25) independientemente de la concentración de heparina ($P < 0.06$). La tasa total de desarrollo de embriones de 2 células a estado de blastocisto fue 32.1% (75/234). No hubo diferencias en la tasa de desarrollo entre grupos. De 234 ovocitos co-cultivados en LLOEC por 9 días, 15.8% desarrollaron de 2 a 16 células, 5.6% en mórula, 6.0% se convirtieron en blastocistos tempranos o expandidos y 4.7% llegaron a blastocistos eclosionados. Los resultados indican que el sistema de fecundación *in vitro* es posible en llama utilizando material de matadero y que los ovocitos de llama pueden ser fecundados en presencia de heparina y espermatozoides epididimarios. En conclusión, los ovocitos de llama pueden ser madurados y fecundados *in vitro* y co-cultivados en LLOEC. Esta técnica puede abrir ahora nuevos enfoques para el estudio de mecanismos básicos de fecundación y desarrollo de embriones en camélidos sudamericanos. Condiciones óptimas para IVM e IVF todavía deben determinarse.

Manrique y Taype (2017), evaluaron el efecto del co-cultivo en el desarrollo de embriones de alpaca (*Vicugna pacos*) producidos por fecundación *in vitro*. Las muestras de ovarios, testículos y oviducto fueron obtenidas de animales sacrificados en el camal municipal de Huancavelica y fueron trasladados al Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica. Solo se aspiraron complejos ovocitos-cumulus (COCs) de folículos ováricos de 3-6 mm de diámetro. Los COCs fueron seleccionados y madurados *in vitro* por un tiempo de 36 horas, luego se fecundaron en medio FERT TALP. Los espermatozoides fueron recuperados de la cola del epidídimo en medio SPERM-TALP los cuales fueron capacitados y seleccionados por el método swim up. Finalmente los COCs fueron inseminados con una concentración espermática de 3×10^6 espermatozoides/ml por un periodo de 18 horas. Para realizar los co-cultivos de células de la granulosa y del oviducto, se cultivaron en medio DMEM por 2 días hasta observar la confluencia celular, luego se tripsinizaron, recuperaron y se colocaron en medio SOF IVC por 1 día; mientras para el grupo control (sin co-cultivo) solo se utilizó medio SOF IVC. Después de 18 horas posteriores a la inseminación los embriones se colocaron al azar en los sistemas de co-cultivo y el grupo control en una incubadora (38.5°C, 90%

de humedad, y 5 de CO₂) por 8 a 10 días. Las tasas medias de división, mórula y blastocisto fueron 39.9%, 25.5% y 12.9% respectivamente. La división no fue influenciada por el co-cultivo (células de la granulosa y del oviducto) ($p > 0.05$); la mórula fue influenciada por el co-cultivo ($p < 0.05$), se obtuvo menores tasas de mórula en co-cultivos de células de la granulosa, en cambio no hubo diferencias entre el grupo control y el co-cultivo con células del oviducto; el porcentaje de blastocitos ha sido influenciado por el co-cultivo celular ($p < 0.05$), se observan mayores porcentajes de blastocistos en co-cultivo con células del oviducto y menores porcentaje en el co-cultivo con células de la granulosa. Concluyendo que el co-cultivo no afecta a la división; pero si afecta a las tasas de mórula y blastocisto.

Ruiz et al (2021) compararon el uso de diferentes sistemas de co-cultivo de embriones de alpaca producidos por fecundación *in vitro*. Los espermatozoides epididimarios seleccionados por swim up fueron usados para inseminar *in vitro* ovocitos previamente madurados por 26 horas. Después de 18 horas de co-cultivo de los espermatozoides y los ovocitos en medio FERT-TALP, los presuntos cigotos fueron colocados en uno de los tratamientos según correspondía. Se evaluaron 4 sistemas de co-cultivo: fibroblastos de oreja (T1, n=224), fibroblastos fetales (T2, n=154), células de la granulosa (T3, n=225), células de oviducto (T4, n=169) y cultivo *in vitro* en fluido sintético de oviducto (SOF IVC, T5, n=116). Como medio base, utilizaron 0.5 mL de medio SOF – IVC suplementado con suero fetal bovino al 10% en todos los tratamientos. Las tasas de división fueron mayores ($p < 0.05$) en co-cultivo con fibroblastos fetales ($46\% \pm 0.17$), células de oviducto ($50\% \pm 0.09$) y fibroblastos de oreja ($58\% \pm 0.17$) que con células de la granulosa ($28\% \pm 0.12$) y SOF IVC ($30\% \pm 0.18$). También, las tasas de mórulas fueron mayores ($p < 0.05$) en co-cultivo con fibroblastos fetales ($35\% \pm 0.16$), células de oviducto ($31\% \pm 0.01$) y fibroblastos de oreja ($35\% \pm 0.14$) que con células de la granulosa ($11\% \pm 0.01$) y SOF IVC ($27\% \pm 0.17$). Finalmente, no hubieron diferencias ($p > 0.05$) en las tasas de blastocistos entre el co-cultivo con células de la granulosa ($10\% \pm 0.04$), SOF IVC ($12\% \pm 0.09$) y fibroblastos fetales ($24\% \pm 0.14$). Sin embargo, si hubieron diferencias entre el co-cultivo con células de oviducto ($19\% \pm 0.06$) y fibroblastos de oreja ($32\% \pm 0.14$). En conclusion, fibroblastos de oreja, células de oviducto y fibroblastos fetales fueron las mejores células para producir embriones de alpaca por FIV.

Sincronización de hembras receptoras de embriones FIV

Existen pocos reportes sobre la transferencia de embriones producidos por fecundación *in vitro* en camélidos sudamericanos (Trasorras *et al.*, 2011, 2014; Mendoza *et al.*, 2014; Landeo *et al.*, 2016). La mayoría de estudios de FIV en camélidos sudamericanos han estado orientados a mejorar las tasas de desarrollo embrionario y lograr producir blastocistos *in vitro* (Ruiz 2015). Actualmente se puede observar en los reportes de FIV en camélidos que la mayoría logra desarrollo *in vitro* hasta producir blastocistos incluso un alto porcentaje llegan a eclosionar, lo cual es un síntoma de un buen desarrollo (Ruiz 2018). Trasorras *et al.* (2011), reportaron el primer intento de transferencia de embriones FIV de llama, ellos para sincronizar a las llamas receptoras de los embriones FIV producidos, un día después de la cirugía de llamas donantes para la recuperación de los ovocitos, las receptoras con un folículo dominante recibieron una dosis única IV de 8 µg de buserelina para inducir la ovulación y dos días después la ovulación fue confirmada por ecografía transrectal. La transferencia de embriones transcervical se realizó el sexto día después de la aplicación de buserelina, ninguna de las 10 llamas hembras que recibieron un embrión quedó preñada. Posteriormente, Trasorras *et al.* (2014), realizaron un nuevo intento, en el cual transfirieron 15 embriones FIV de llama, la sincronización de las receptoras se realizó exactamente igual que en el anterior reporte (Trasorras *et al.*, 2011). Se detectó por ecografía una llama receptora preñada el día 23 después de la transferencia del embrión, y a partir del día 37 se observó que la vesícula embrionaria perdía tamaño y finalmente el día 42 desapareció completamente.

En otro estudio (Mendoza *et al.*, 2013), transfirieron 8 embriones FIV de alpacas, para lo cual se utilizaron 5 llamas y 3 alpacas como receptoras, las cuales fueron sincronizadas con CIDR durante 7 días, el día 12 (día 0 = colocación del CIDR) las receptoras recibieron 1 ml de GnRH para inducir la ovulación y 8 días después los embriones fueron transferidos. Se hizo la evaluación ecográfica 30 días después de la transferencia de los embriones y se encontró 3 llamas y una alpaca preñadas, ninguna de las 4 receptoras logró culminar la gestación con éxito. En el año 2015 (Landeo *et al.*, 2016), el laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica logró el nacimiento de una llama producida por FIV, utilizando un protocolo de FIV y de sincronización

de receptoras similar al reportado por Mendoza *et al.*, (2013), se realizaron 15 transferencias de embriones, en esta oportunidad todas las receptoras fueron llamas. Se transfirieron 9 embriones de alpacas y 6 embriones de llamas producidos por FIV, se obtuvieron 6 gestaciones tempranas, de las cuales sólo 4 continuaron su desarrollo y 3 fueron abortadas entre los 7 y 10 meses de gestación, y solamente una llama logró terminar la gestación satisfactoriamente, produciéndose el primer nacimiento del Mundo de una cría FIV de camélidos sudamericanos. Estos reportes son alentadores, sin embargo faltan mayores estudios para lograr estandarizar esta biotecnología reproductiva y lograr mayor cantidad de crías. Por lo que actualmente los esfuerzos de investigación FIV en camélidos sudamericanos deben concentrarse en lograr mayores tasas de nacimiento, para ello son necesarios mayores estudios para la sincronización de receptoras de embriones FIV en camélidos sudamericanos.

CONCLUSIONES

Con 26 horas de tiempo de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca se obtuvo mejores tasas de desarrollo embrionario que con 30, 34, 38 y 42 horas. Es necesario evaluar menores tiempos a 26 horas para confirmar cuál es el tiempo óptimo de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca. SOF IVC y KSOM son los mejores medios para el cultivo de embriones de alpaca producidos por fecundación *in vitro*. TCM 199 y CR1aa se pueden utilizar pero dan menores tasas de mórulas y blastocistos. La heparina y la cafeína no son necesarias para la capacitación de espermatozoides epididimarios de alpaca. El uso del co-cultivo es beneficioso para el desarrollo embrionario *in vitro*, los fibroblastos de oreja, células de oviducto y fibroblastos fetales fueron las mejores células para co-cultivar embriones de alpaca producidos por fecundación *in vitro*. Son necesarios estudios para sincronizar receptoras de embriones de alpacas producidos por fecundación *in vitro*, teniendo en cuenta el momento de la inseminación *in vitro* de los ovocitos de alpaca al diseñar el protocolo de sincronización de la receptora.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams GP, PG Griffin, OJ Ginter. 1989. *In situ* morphologic dynamics of ovaries, uterus and cervix in llamas. *Biol Reprod* 41, 551–558.
- Adams GP, J Sumar, OJ Ginther. 1990. Effects of Lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *J Reprod Fertil* 90, 535–545.
- Aller, J., G. Rebuffi, A. Cancino, R.H. Alberio. 2002. Successful transfer of vitrified llama (*Lama glama*) embryos. *Anim Reprod Sci* 73: 121 – 127.
- Apaza, N., R. Sapaná, T. Huanca, y W. Huanca. 2001. Inseminación Artificial en alpacas con semen fresco en comunidades campesinas. *Rev. Invest. Vet. Perú*; 435 – 438
- Apaza, N., U. Olarte, y J. Málaga. 1998. Empadre controlado de alpacas Huacaya en el Banco de Germoplasma de la E.E. ILLPA Puno. Memorias de la XXI Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Universidad Nacional del Altiplano. Puno-Perú; 45.
- Arriaga I., Huanca W., Terreros M., Becerra J., García P., Ampuero A. 2014. Efecto de Temperatura y Tiempo de Almacenamiento de Ovarios de Alpacas sobre la Tasa de Maduración y División *in vitro* de Ovocitos. *Rev Inv Vet Perú* 2014; 25(4): 477-486.
- Ayuque A., E. Justiniano, J. Mendoza, L. Landeo, J. Ruiz. 2014. Efecto del tiempo de maduración *in vitro* en la capacidad meiótica y desarrollo de embriones de llama. *Spermova*. 2014; 4(1): 99 – 101.
- Bavister B.D., Yanagimachi R. 1977. The effects of sperm extract and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster sperm *in vitro*. *Biol. Reprod.* 16, 228–237.
- Berland M., A. Von Baer, V. Parraguez, P. Morales, G. Adams, M. Silva, J. Ruiz, y M. Ratto. 2011. *In vitro* fertilization and development of cumulus oocytes complexes collected by ultrasound-guided follicle aspiration in super stimulated llamas. *Theriogenology*. Vol. 75, Issue 8, Pages 1482-1488.
- Bosch P., Blanch M., Díaz S., Piccato H., Bosch F. 2006. Desarrollo de Embriones Caprinos *In Vitro*: Efecto Del Co-Cultivo Con Células Epiteliales De Oviducto Revista Científica. Universidad del Zulia. Venezuela; 3:273-281.
- Bourke D.A., C.E. Kyle, T.G. Mc. Evoy, P. Young, C.L. Adam. 1995a. Advanced reproductive technologies in South American Camelids. In: Proceedings

- of the Second European Symposium on South American Camelids, pp 235-243.
- Bourke D.A., C.E. Kyle, T.G. Mc. Evoy, P. Young, C.L. Adam. 1995b. Recipient synchronization and embryo transfer in South American Camelids. *Theriogenology* 43: 171.
- Bourke D.A., C.L. Adam, C.E. Kyle, T.G. Mc. Evoy, P. Young. 1992. Ovulation, superovulation and embryo recovery in llamas. Proc. 12th Int Congr Anim.Reprod. *The Hague*, 23-27 August 1, 193-195.
- Bonavia, D. (1996) Los Camélidos Sudamericanos: Una inducción a su estudio. Lima. PE. Ed-IFEA; 494-501.
- Conde P., C. Herrera, V. Trasorras, S. Giuliano, M. Miragaya, M. Chaves, M. Carchi, D. Stivale, C. Quintan, A. Agüero, B. Rutter, y S. Pasqualini S. 2008. *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Animal Reproduction Science*; 109:298-308.
- Conde P., C. Herrera, M.G. Chaves, S.M. Giuliano, A. Director, V.L. Trasorras, M. Pinto, M.I. Carchi, D. Stivale, B. Rutter, A. Agüero, M.H. Miragaya, R.S. Pasqualini. 2006. *In vitro* production of llama embryos by IVF or ICSI. *Reproduction, Fertility and Development* 19 (1) Pages 237 – 238.
- Condori R, W Huanca, M Chileno, J Cainzo, F Valverde, JJ Becerra, L A Quintela, PG Herradon. 2010. Effect of follicle-stimulating hormone addition on *in vitro* maturation and cleavage of alpaca (*vicugna pacos*) embryos. *Reproduction, Fertility and Development* 23(1) 224-224.
- Del Campo M. 1997. Reproductive Technologies in South American Camelids. In: Current Therapy in Large Animals. *Theriogenology*. Ed. Robert S. Younquist. Publisher W.B. Saunders Co. Chapter: 128. pp. 836-839.
- Del Campo M., C. Del Campo, M. Donoso, M. Berland, R.J. Mapletoft. 1994. *In vitro* fertilization and development of *Lama glama* oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology* 41: 1219-1229.
- Fernández Baca S. 1993. Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. *Anim Reprod Sci* 33, 307-323.
- Fernandez N., Vasquez T., Manuel G., Perez D., Luis V., Olivera M. y Uri H. 2015. Efecto de dos Métodos de Colección sobre la Cantidad y Calidad Ovocitaria de Alpacas (*Vicugna pacos*) y llamas (*Lama glama*) Post Mortem. *Rev. Investing. Altoandin.*, 3: 331-340.

- Franco E., C. Ordoñez, E. Ampuero. 1999. Retorno del celo y fertilidad de alpacas post-superovuladas utilizando PGF2 α . Memorias de la XXIII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Universidad Nacional de Huancavelica – Perú.
- Gamarra G., E. Huamán, S. León, M. Carpio, E. Alvarado, M. Asparrin and W. Vivanco. 2008. First *in vitro* embryo production in alpacas (lama pacos). *Reproduction Fertility and Development* 21 (1): 177-178.
- Gardner D.K., M. Lane, A. Spitzer, P.A. Batt. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes culture to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulated development. *Biol. Reprod.* 50, 390–400.
- Gatica R., M. Ratto, C. Schuler, M. Ortiz, J. Oltra, J.E. Correa. 1994. Cría obtenida en una llama (*Lama glama*) por transferencia de embriones. *Agric. Tec. (Chile)* 54, 68–71.
- Gómez C, M.H. Ratto, M. Berland, M. Wolter, G.P. Adams. 2002. Superstimulatory response and oocyte collection in alpacas. *Theriogenology* 57:584.
- Huamán E., F. Tiellacuri, L. Landeo y J. Ruiz. 2011. Efecto de la atmósfera de cultivo sobre el desarrollo de embriones de alpaca producidos por fecundación *in vitro*. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú. XXXIV Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Trujillo – Perú.
- Huanca W., Condori R., Chileno M., García P., Cainzo J., Becerra J. 2014. Evaluación de Cuatro Tiempos de Cultivo sobre la Tasa de Maduración y División Post fecundación *in vitro* de Ovocitos de Alpaca. *Rev Inv Vet Perú* 2014; 25(4): 468-476
- Huanca W., R. Condori, M. Chileno, J. Cainzos, J. Becerra, L. Quintela, PG Herradón. 2010. ***In vivo* maturation and *in vitro* fertilization of alpaca oocytes.** *Reproduction, Fertility and Development* 23(1) 204-205.
- Huanca W., R. Condori, J. Cainzos, M. Chileno, L. Quintela, J. Becerra, PG Herradón. 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(1) 327–327.
- Landeo L., R.S. Molina, M.E. Zúñiga, T.R. Gastelu, C. Sotacuro, J. Ruiz. 2017. *In vitro* development of alpaca embryos obtained by bisection. *Reproduction, Fertility and Development* 30(1) 189-189.

- Landeo L., J. Mendoza, L. Manrique, E. Taipe, R. Molina, J. Contreras and J. Ruiz. 2016. First llama born by *in vitro* fertilization. *Reproduction, Fertility and Development* 29(1) 188-188.
- Lopez A., Olivera M., Ruiz T., Tarazona A. 2007. Efecto del co-cultivo sobre el desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Rev MVZ Córdoba*; 12: 1061.
- Machicado R., P. Delgado y M. Flores. 2009. Descripción del proceso de fertilización *in vitro* de ovocitos de llama (*Lama glama*) obtenidos por super estimulación ovárica con eCG y fertilizados con semen tratado con proteasa. V Congreso Mundial sobre Camélidos. Riobamba, Ecuador.
- Mamani-Mango G., M. Moina, M. Ramos, J. Mendoza, J. Ruiz, V.Rivas, E. Mellisho. 2019. Effect of extender and freezing rate on quality parameters and *in vitro* fertilization capacity of alpaca spermatozoa recovered from cauda epididymis. *Biopreservation and Biobanking*. Volume 17, Issue 1: February 13, 2019. 39 – 45.
- Manrique L., E. Taype. 2017. Efecto del co-cultivo en el desarrollo de embriones de alpaca (*Vicugna pacos*) producidos por fecundación *in vitro*. Tesis para optar al título de Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de Huancavelica.
- Mellisho E., V. Rivas, J. Ruiz, G. Mamani. 2014. Effect of sperm selection on the rate of *in vitro* fertilization in alpaca (*vicugna pacos*). *Reproduction Fertility and development* 27(1) 217-218.
- Mendoza J., L. Landeo, M. Yauri, L. Manrique, R. Molina, F. Castañeda, J. Contreras, Ruiz J. 2013. 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. UNMSM. Lima – Perú.
- Mendoza J., A. Ayuque, F. Triviño, G. Ayuque, M. Yaranga, L. Landeo, M. Artica y J. Ruiz. 2008. Evaluación de dos métodos de separación 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.
- Palma GA. 2001. Producción *in vitro* de embriones. En Palma GA. Primera edición. Biotecnología de la Reproducción. Pp 225-282. INTA Balcarce.

- Palomino Martorell H., 2000. Biotecnología del trasplante y micromanipulación de embriones de bovinos y camélidos de los Andes. A.F.A. Editores Importadores, Perú, p. 266 (Chapter 11).
- Palomino H., L. Tabacchi, E. Avila, O. Li. 1987. Ensayo preliminar de transferencia de embriones en camélidos sudamericanos. *Rev de Camélidos Sudamericanos* 5: 10-17.
- Perez M., Zeballos J., Perez U. 2017. Comparación de sistemas de cultivo de embriones de alpacas. *Rev. Investing. Altoandín.*, 19, 157-164.
- Rath D. 2001. Producción *in vitro* de embriones porcinos. En Palma GA. Primera edición. Biotecnología de la reproducción. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)*, Balcarce. Argentina.
- 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 Wolter, C Gomez, M Berland, GP Adams. 1999. *In vitro* maturation of lama oocytes. Memorias del II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cuzco, Perú.
- Rosenkrans C.F., G.Q. Zeng, G.T. Mcnamara, P.K. Schoff and N.L. First. 1993. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biology of Reproduction*, 49: 459-462.
- Ruiz J, M Artica y L Landeo. 2021. Effect of the co-culture system and the culture medium on *in vitro* embryo development in alpacas (*Vicugna pacos*). *Reproduction, Fertility and Development* 33(2) 140-140
- Ruiz J, y Artica M. 2021. Optimización de la fecundación *in vitro* para la conservación del material genético de las alpacas (*Vicugna pacos*) de la comunidad campesina de Carhuancho Distrito de Pilpichaca Provincia de Huaytará, Región Huancavelica. Informe Final de Proyecto FOCAM.
- Ruiz J. 2019. Avances en fecundación *in vitro* en camélidos sudamericanos en la Universidad Nacional de Huancavelica. Capítulo IV. En: *Avances de investigación en camélidos sudamericanos* (págs. 75-80). Autor: Jaime Ruiz Béjar. Editor: Universidad Nacional de Huancavelica.
- Ruiz J. 2018. Producción y transferencia de embriones *in vitro* en camélidos sudamericanos: nuevas oportunidades y desafíos. *Spermova* 2018; 5 (1): 54 – 60.

- Ruiz J., P. Santayana, J. Mendoza, L. Landeo, E. Huamán, F. Ticllacuri, F. Mujica, M. Silva, M.H. Ratto. 2017. Effect of oocyte maturation time, sperm selection method and oxygen tension on *in vitro* embryo development in alpacas. *Theriogenology*. Vol. 95, Pages 127-132.
- Ruiz J. 2015. Estado de la producción de embriones *in vitro* en camélidos sudamericanos. *Spermova* 2015; 5 (2): 264 – 269.
- Ruiz J. 2011. Biotecnologías reproductivas aplicadas en la hembra de los camélidos sudamericanos. Capítulo VIII. En: Producción y tecnología en Camélidos sudamericanos. Editor: Jaime Ruiz Béjar. Universidad Nacional de Huancavelica. Pp 169 – 202.
- Ruiz J., L. Landeo, M. Artica, M. Ratto, J. Correa. 2011. Activación química de ovocitos de alpaca vitrificados después de la maduración *in vitro*. *Rev Inv Vet Perú* 22 (3): 206 – 212.
- Ruiz J., J.E. Correa, G. Ayuque, L. Landeo, M. Yaranga, A. Zacarías. 2007. Producción *in vitro* de embriones partenogénéticos de alpaca y llama. Memorias del I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú.
- Ruiz JA, JE Correa. 2007. Maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca y llama aspirados vía laparoscópica. Memorias del I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú.
- Sansinena M., S. Taylos, P. Taylor, E. Schmidt, R. Denniston, R. Godke. 2007. *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Anim Reprod Sci* 99 (3-4):342-353.
- Santayana P., J. Mendoza, L. Landeo, F. Mujica y J. Ruiz. 2012. Tiempo de maduración de ovocitos de alpaca en el desarrollo embrionario por fecundación *in vitro*. En: VI Congreso Mundial de Camélidos. 2012. Arica. Chile.
- Sumar J., E. Franco. 1974. Informe Final IVITA-La Raya. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, Lima, Perú.
- Tervit H.R., D.G. Whitting, L.E.A. Rowson. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.* 30, 493-497.
- Taylor P., 2003. Practical embryo transfer in the south american camelids. Memorias del III Congreso Mundial sobre Camélidos. Potosí-Bolivia.

- Taylor S., P. Taylor, A. James, R. Godke. 2000. Successful commercial embryo transfer in the llama (*Lama glama*). *Theriogenology* 53: 344.
- Trasorras V., C. Baca Castex, A. Alonso, S. Giuliano, R. Santa Cruz, C. Arraztoa, G. Chaves, D. Rodríguez, D. Neild, M. Miragaya. 2014. First llama (*Lama glama*) pregnancy obtained after *in vitro* fertilization and *in vitro* culture of gametes from live animals. *Animal Reproduction Science*. Volume 148, Issues 1–2, Pages 83-89.
- Trasorras V.L., S. Giuliano, M.G. Chaves, D. Neild, A. Agüero, M. Carretero, M. Pinto, C. Baca Castex, A. Alonso, D. Rodríguez, J. Morrell, M. Miragaya. 2012. *In vitro* embryo production in llamas (*Lama glama*) from *in vivo* matured oocytes with raw semen processed with AndrocollE using defined embryo culture media. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 562–567.
- Von Baer A., L. Von Baer, M. Donoso, P. Poblete, H. Miranda, M. Del Campo. 2003a. Efecto de diferentes parámetros en un programa de transferencia de embriones en llamas (*Lama glama*) y alpaca (*Lama pacos*). *Memorias del III Congreso Mundial sobre Camélidos*. Potosí-Bolivia.
- Von Baer, A, L. Von Baer, X. Donoso, M. Del Campo. 2003b. Transferencia de Embriones entre Especies de Camélidos Sudamericanos. *Memorias del III Congreso de la Asociación Latinoamericana de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos*. ALEPRYCS. Viña del Mar, Chile.
- Wiepz D.W., R.J., Chapman. 1985. Non-surgical embryo transfer and live birth in a llama. *Theriogenology*. 24: 251-257.

CAPÍTULO VIII

ASPIRACIÓN FOLICULAR DE OVOCITOS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Jaime Ruiz, Mauricio Silva y Marcelo H Ratto

RESUMEN

En este capítulo se presenta el avance de la investigación relacionada con la obtención de ovocitos de alpaca y llama con la técnica de aspiración folicular guiada por ultrasonografía. Los primeros reportes y por mucho tiempo los trabajos de investigación sobre la aplicación de fecundación *in vitro* en camélidos sudamericanos se realizaron utilizando gametos recuperados de gónadas obtenidas de animales beneficiados en camales. Estos trabajos sirvieron para optimizar protocolos de maduración y fecundación *in vitro*. El año 2000 se presentó el primer reporte de la recuperación de complejos ovocito-cúmulo (COCs) de llama y años después en alpaca, en estos trabajos se describen la adaptación de la técnica de aspiración de COCs en estas especies, se evaluaron las tasas de recuperación relacionadas con la cantidad de folículos observados ecográficamente, se evaluó la morfología y el estado de maduración nuclear de los ovocitos recuperados, también la respuesta obtenida según protocolo de sincronización de la donante o protocolos de estimulación ovárica. El año 2011 se presentó el primer reporte de aspiración folicular de llamas vivas, se encontró que no había diferencias entre los COCs recuperados después de la estimulación ovárica con FSH y eCG en cuanto a la calidad y cantidad de COCs recuperados y después de la fecundación *in vitro* los embriones desarrollaron hasta el estado de blastocisto en forma similar con ambos tratamientos de estimulación ovárica. Recientemente se ha reportado la competencia de desarrollo de ovocitos de alpaca recuperados con la técnica de aspiración folicular, en este trabajo se evaluó la capacidad meiótica frente a los COCs provenientes de ovarios obtenidos del camal. Se recuperó ovocitos de mejor calidad aspirados desde ovarios de camal frente a los ovocitos recuperados con la técnica de aspiración folicular, sin embargo se obtuvo mejor tasa de blastocistos con los ovocitos recuperados transvaginalmente, debido a que fueron recuperados de una onda folicular en crecimiento al parecer como consecuencia de tratamiento de sincronización de

las alpacas donantes de ovocitos, en cambio en los ovarios de camal la población de folículos es heterogénea y no es posible distinguir en qué fase de su desarrollo se encuentran.

INTRODUCCIÓN

Los primeros trabajos de investigación en camélidos sudamericanos aplicando la maduración y fecundación *in vitro*, fueron realizados con gametos provenientes de animales beneficiados en matadero (Del Campo et al., 1994; Ratto et al., 2005). Mediante esta forma de trabajo se obtuvo valiosa información que ha servido de gran ayuda porque ha permitido estandarizar protocolos para la maduración y fecundación *in vitro* (Ruiz et al., 2017) y el nacimiento de una cría llama por primera vez en el mundo (Landeo et al., 2016). Sin embargo, fueron sólo con fines de investigación más no contribuyeron al mejoramiento genético debido a que los gametos utilizados fueron provenientes de animales destinados a descarte con caracteres productivos como finura y peso de vellón no deseables para transmitir en las siguientes generaciones. Además, los COCs provenientes de camal se encuentran en diferentes estadios de desarrollo meiótico, motivo por el cual las tasas de desarrollo embrionario obtenidos, no han superado el 30% de blastocistos (Gamarra et al., 2008; Ayuque et al., 2014; Ruiz et al., 2017). Por otro lado, los COCs recuperados por OPU son aquellos provenientes de una única onda folicular en fase de crecimiento o estática, razón por la cual las tasas de desarrollo embrionario hasta blastocistos son superiores al 30% (Trasorras et al., 2012).

Una forma alternativa para la recuperación de complejos ovocito - cúmulo (COCs) de alpacas y llamas *in vivo*, es el uso de la técnica de aspiración transvaginal guiada por ultrasonografía (Brogliatti et al., 2000), ya que se sabe que en esta especie las hembras sólo pueden llegar a tener en forma natural 4 a 5 crías en toda su vida reproductiva, sin embargo con esta técnica podemos recuperar ovocitos de alpacas o llamas, fecundarlos *in vitro* y producir embriones transferibles lo que nos permitiría obtener varias crías al año de una donante de ovocitos y de esta manera maximizar el potencial genético deseable de las hembras en estas especies (Ruiz 2019). Además se trata de una técnica repetible y de fácil aplicación ya que es una técnica poco invasiva y no conlleva riesgos a las donantes durante su aplicación. En ese sentido, para implementar un programa de mejoramiento genético mediante la fecundación *in vitro* se requieren usar gametos de animales

de alto valor genético, para ello es indispensable estandarizar un protocolo de recuperación de complejos ovocito- cúmulo (COCs) para hembras de camélidos domésticos donantes de ovocitos por el sistema *Ovum pick up* (OPU) y evaluar la capacidad meiótica de estos ovocitos. Además, los COCs colectados por esta técnica pueden ser utilizados para la producción de embriones por inyección intracitoplasmática de espermatozoides, fecundación *in vitro*, bipartición, transferencia nuclear y *handmade cloning*, (Ruiz y Ratto, 2011).

La aspiración transvaginal guiada por ultrasonografía ha sido descrita como una técnica no invasiva y repetible en equinos, caprinos y vacunos (Bracher et al., 1993; Graff et al., 1995; Kruij et al., 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*. 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.

Posibilidad en Camélidos Sudamericanos

Para que la fecundación *in vitro* tenga un real impacto en la mejora genética se deben fecundar los ovocitos de las mejores alpacas hembras con semen de los mejores reproductores macho. Para ello, las alpacas donantes de ovocitos deben ser seleccionadas de acuerdo a su mejor finura de fibra y densidad de vellón. El uso de la aspiración transvaginal guiada por ultrasonografía se presenta como una buena alternativa para recuperar COCs de llamas y alpacas. Sin embargo, existen pocos reportes del uso de esta técnica para la recuperación de COCs en llamas (Brogliatti et al., 2000; Ratto et al., 2005) y en alpacas (Huanca et al., 2006; Gamarra et al., 2007), lo ausente en estas investigaciones es una evaluación sobre la competencia de desarrollo de los ovocitos en alpacas y llamas después de su fecundación *in vitro*. Sólo se han fecundado ovocitos de llama recuperados por aspiración transvaginal por ICSI (Sansinema et al., 2007) y por FIV (Berland et al., 2011), quedaba pendiente la evaluación del uso de ovocitos de alpacas recuperados por aspiración transvaginal para la FIV, sin embargo, Landeo et al. (2021) lo han reportado recientemente.

Gamarra et al., (2007) recuperaron 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. Por otro lado, 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 super estimuladas 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, Ratto et al. (2005), en llamas que fueron tratadas 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 describieron 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.

Sansinema et al. (2007), utilizando la 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. Por otro lado, Huanca et al. (2006), encontraron 4.5 folículos ováricos/alpaca los cuales fueron 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.

Competencia de desarrollo de ovocitos aspirados de hembras vivas

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 $38,5^{\circ}\text{C}$ con 5% CO_2 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 co-incubados con células de la granulosa de llama a 39°C , 5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2 por 7 días. El porcentaje de presumibles 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.

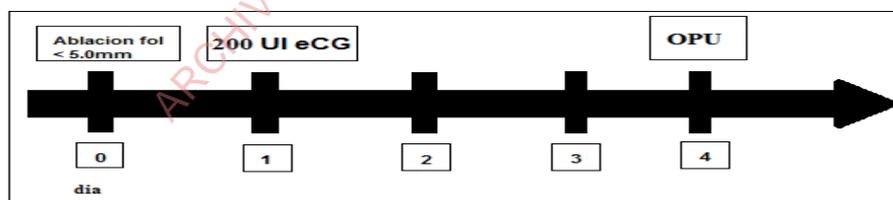


Figura 1. Protocolo de sincronización de donantes de ovocitos de alpaca utilizado por Zúñiga y Gastelu (2019), adaptado de Ratto et al (2007).

Landeo et al. (2021), evaluaron la calidad del complejo ovocito-cúmulos (COCs) mediante el sistema *Ovum pick up* (OPU) en alpacas (*Vicugna pacos*) y evaluaron la capacidad meiótica frente a los COCs provenientes de ovarios obtenidos del Camal Municipal de Huancavelica. Para el estudio utilizaron 30 ovarios de 15 alpacas hembras vivas y 30 ovarios de 15 alpacas beneficiadas del camal, de las cuales 13 alpacas donantes de COCs fueron evaluadas a la respuesta ovárica a la superestimulación con 200 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG),

donde se detectaron 67 folículos ≥ 5 mm como respuesta a los tratamientos de superestimulación con una tasa de colección de ovocitos de 51.54%. Con la técnica OPU se recuperó 50 COCs/alpaca vs 128 COCs/ovario evidenciando diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$). En cuanto a la calidad de COCs obtenida por la técnica OPU, se registraron 6.15; 17.69; 36.54 y 31.92% de COCs de calidad I, II, III y IV respectivamente, frente a 56.2; 15.0; 16.4 y 12.5% de COCs de calidad I, II, III y IV respectivamente para ovocitos recuperados de ovarios obtenidos post mortem, donde la técnica OPU influyó negativamente sobre la calidad de COCs ($P > 0.05$), a diferencia que el otro método donde se obtuvo el mayor porcentaje de calidad I. Se utilizaron ovocitos de calidad 1 y 2 para la maduración, fecundación y cultivo *in vitro* de embriones hasta el día 7. Finalmente se evaluó la capacidad meiótica de COCs obtenidos por ambos métodos, donde se obtuvo tasas de división [(57.62 \pm 22.08) % y (49 \pm 11.47) %] y mórulas [(55.6 \pm 23.82) % y (42 \pm 10.39) %] similares de aquellos COCs recuperados por OPU y ovarios obtenidos post mortem respectivamente, sin mostrar diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$). Sin embargo, la tasa de blastocistos temprano por sistema OPU (55.69 \pm 23.82)% fue superior a las tasas de blastocistos tempranos obtenidos de los ovarios de camal (34,6 \pm 2,90)%, respectivamente ($P < 0.05$). Se concluye que las mejores tasas de desarrollo embrionario se obtienen a partir de la técnica OPU que de aquellos recuperados por ovarios obtenidos post mortem, el resultado depende de la técnica del operador al momento de realizar la aspiración folicular de COCs mediante esta técnica. Este estudio representa el primer reporte de desarrollo embrionario *in vitro*, usando ovocitos recuperados por ovum pick up en alpacas.



Figura 2. Sesión de aspiración folicular en alpacas. A la izquierda se observa el ecógrafo y la bomba de aspiración folicular de color negro en el piso y a la derecha se aprecia la aguja que el asistente tiene lista para que la operadora principal la introduzca e inicie la sesión de aspiración de folículos.

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 y alcanzar el estado de blastocisto en el cual se puede transferir a receptoras sincronizadas. En futuros trabajos de investigación se deben transferir los embriones y tratar de lograr preñeces y nacimientos con esta técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayuque A, Justiniano E, Mendoza J, Landeo L, Ruiz J. Efecto del tiempo de maduración in vitro en la capacidad meiótica y desarrollo de embriones de llama. *SPERMOVA*. 2014; 4(1): 99 – 101.
- 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 super stimulated llamas. *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.
- 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.
- 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.

- 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.
- Landeo L, Zúñiga M, Gastelu TR, Ruiz J. 2021. In vitro embryonic development from oocytes collected by ovum pick up of super stimulated females and no stimulates slaughterhouse ovaries of alpaca (*Vicugna pacos*). *Reproduction, Fertility and Development* 33(2) 117-117.
- Landeo L, Mendoza J, Manrique L, Taípe E, Molina R, Contreras J, Ruiz J. First Llama born by in vitro fertilization. 2016. *Reproduction, Fertility and Development* 29(1) 188-188.
- Ratto M, Gómez C, Berland M, Adams G. 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.
- Ruiz J. 2019. Avances en fecundación in vitro en camélidos sudamericanos en la Universidad Nacional de Huancavelica. Capítulo IV. En: *Avances de investigación en camélidos sudamericanos* (págs. 75-80). Autor: Jaime Ruiz Béjar. Editor: Universidad Nacional de Huancavelica.
- Ruiz J., Santayana P., Mendoza J., Landeo L., Huaman E., Tiellacuri F., Mujica F., Silva M., Ratto M. 2017. Effect of oocyte maturation time, sperm selection method and oxygen tension on *in vitro* embryo development in alpacas. *Theriogenology* 95, 127-132.
- Ruiz J, Ratto M. 2011. Capacidad de desarrollo de ovocitos recuperados vía aspiración transvaginal en llamas y alpacas. *Spermova*: 2011, 1(1): 77-79.

- 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.
- Trasorras, V.; Giuliano, S.; Chaves, M.; Baca Castex, C.; Carretero, V.; Negro, A.; Rodriguez, D.; Miragaya, M. 2012. *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. *Reprod Domest Anim*, 47(4): 562-7.
- Zúñiga, E y Gastelú T. Evaluación de la capacidad meiótica de ovocitos de alpacas (*Vicugna Pacos*) recuperados por sistema *ovum pick up* (Opu) y de ovarios obtenidos post mortem. 2019. Tesis de ingeniero zootecnista. Universidad Nacional de Huancavelica.

ARCHIVO SOLO PARA VISUALIZACIÓN DIGITAL

CAPÍTULO IX

VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Leandra Landeo y Jaime Ruiz

RESUMEN

La vitrificación es una técnica de congelación ultrarrápida basada en el contacto directo entre la solución de vitrificación que contiene los agentes crioprotectores con las células y el nitrógeno líquido. El proceso de vitrificación requiere la presencia de una alta concentración de soluciones crioprotectoras permeables y una alta velocidad de enfriamiento para facilitar el rápido intercambio del agua intracelular por el crioprotector y evitar la formación de cristales de hielo. Esto se logra reduciendo al mínimo el volumen de las soluciones crioprotectoras y aumentando la velocidad de enfriamiento, lo cual permite minimizar el daño celular que se provoca por el estrés osmótico o la toxicidad química provocada por las altas concentraciones de las soluciones crioprotectoras.

Ovocitos de alpacas han sido vitrificados con éxito con dos técnicas, microgotas y Cryotech®, luego del descongelamiento de los ovocitos se han logrado producir embriones partenogénéticos con la técnica de microgotas y embriones por fecundación *in vitro* con ambas técnicas, los embriones producidos desarrollaron hasta el estado de blastocisto. La vitrificación de ovocitos de alpacas abre la posibilidad de almacenar material genético de hembras de genética superior comprobada. Por otro lado, la técnica de vitrificación podría aplicarse para la criopreservación de ovocitos de camélidos silvestres como la vicuña o el guanaco.

INTRODUCCIÓN

Las poblaciones de camélidos sudamericanos (CSA) en América del Sur se encuentran en Perú, Bolivia, Argentina, Chile y Ecuador, con una población total cercana a los 9 millones de animales. Los derivados obtenidos de la producción de los CSA son la fibra, los productos cárnicos y cueros. En la actualidad, el derivado de mayor demanda comercial es la fibra debido a su finura, es necesario contar con reproductores seleccionados por la finura de su vellón. Por otra parte, los productos cárnicos poseen excelentes propiedades nutricionales, bajo colesterol y elevados niveles de proteínas (Cristofanelli et al., 2004; Salvá et al., 2009). Tanto en Perú como en Bolivia, Argentina, Chile y Ecuador la producción de llamas y alpacas es desarrollada mediante una crianza tradicional, con producción y productividad baja con respecto al peso de vellón, peso de los animales y con un aumento en el grosor de la fibra (FAO, 2005).

De esto surge el gran interés en la aplicación de biotecnologías reproductivas en la llama y alpaca, teniendo en cuenta, a su vez que estas especies domésticas son excelentes modelos experimentales para poder aplicar biotecnologías reproductivas en los CSA silvestres, de tal manera de poder revertir el proceso de extinción (guanaco en Perú, y vicuña en todo el territorio andino).

En las especies domésticas de interés productivo, especies silvestres y en medicina humana, el interés en la preservación por frío de ovocitos ha aumentado por la creciente importancia de la producción de embriones *in vitro*, de la transferencia nuclear y del almacenamiento de material genético en los bancos de germoplasma. Además, el corto tiempo que un ovocito permanece viable y el limitado número que puede ser colectado, hacen que el éxito de la preservación de ovocitos sea de gran interés para la investigación básica y la aplicación comercial (Albarracín et al., 2005).

Vitrificación

Esta técnica surgió en 1985 como un método de congelamiento ultrarrápido, después de la exitosa criopreservación de embriones de ratón a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (revisado por Liebermann et al., 2009). Desde entonces esta técnica ha cobrado mucha importancia en el campo de reproducción animal como método de criopreservación de embriones y ovocitos.

La vitrificación es una tecnología que ha superado a la congelación tradicional en la criopreservación de ovocitos y embriones, mejorando las tasas de supervivencia post descongelamiento y de desarrollo embrionario *in vitro* en diferentes especies (Albarracín et al., 2005). La estrategia de vitrificación es básicamente diferente a la estrategia de congelación tradicional. En esta última, una velocidad lenta de congelación intenta mantener un delicado balance entre varios factores, los cuales pueden resultar en lesiones celulares provocadas por la formación de cristales de hielo, los choques osmóticos, el efecto tóxico de los crioprotectores, la concentración de electrolitos intracelulares, los daños por enfriamiento, las fracturas en la zona pelúcida y las alteraciones de los organelos intracelulares, el citoesqueleto o el contacto entre las células (Massip et al., 1995; Dobrinsky 1996; Martino et al., 1996). La vitrificación elimina totalmente la formación de cristales de hielo ya que al aumentar la velocidad de congelación disminuyen los daños causados por el enfriamiento pasando rápidamente por el rango de temperatura de mayor peligro entre +15 a -5 °C (Dobrinsky 1996; Martino et al., 1996; Isachenko et al., 1998). Para prevenir daños causados durante el enfriamiento, las células son expuestas a altas concentraciones de crioprotectores, los cuales deshidratan a las células rápidamente antes de iniciar el proceso de enfriamiento y favorecen la entrada de los crioprotectores, lo que permite sumergirlas directamente en nitrógeno líquido llevando a cabo la congelación ultrarrápida.

El proceso de vitrificación permite usar soluciones crioprotectoras menos tóxicas y además disminuir el tiempo de exposición de los ovocitos a los agentes crioprotectores (Martino et al., 1996). El éxito de la vitrificación está supeditada a la interacción de varios factores como la viscosidad de los medios durante los procesos de enfriamiento, almacenamiento y atemperado, así como también a la estabilidad de los medios vitrificantes y el grado de toxicidad de los mismos. Por otro lado, un proceso de vitrificación requiere la presencia de alta concentración de crioprotectores, por lo que es necesario minimizar el daño celular provocado por el estrés osmótico y/o por la toxicidad química provocada por estas altas concentraciones pero a su vez, es importante mantener la efectividad de los agentes crioprotectores (Lierberman et al., 2002). Con la finalidad de reducir la toxicidad de las soluciones crioprotectoras se han desarrollado diferentes protocolos donde se combinan uno o varios agentes como los suplementos de azúcares u otras macromoléculas como, la Hidroxipropilcelulosa (HPC) y la trehalosa. El uso de estas macromoléculas podrían contribuir a mejorar los resultados de sobrevivencia, ya que la HPC al ser una macromolécula cuya habilidad de formar un gel viscoso a bajas temperaturas ha sido propuesto como

sustituto de suero fetal bovino (SFB) en muchos protocolos de vitrificación con resultados de sobrevivencia y desarrollo meiótico prometedores (Dalvit et al., 2012; Gutnisky et al., 2013). Del mismo modo, la suplementación de las soluciones de vitrificación con trehalosa facilita la deshidratación parcial de las células creando un desbalance osmótico que ayuda a prevenir la formación de cristales de hielo intracelular (Kuleshova et al., 1999a; Wusteman et al., 2003; Kuleshova et al., 1999b; Sutton, 1991).

Vitrificación de ovocitos

El ovocito posee características únicas como un gran tamaño y una baja relación superficie-volumen. Además, está rodeado por la ZP y por varias capas de células del cúmulus oophorus. La presencia de estas capas celulares que rodean al ovocito hace que sea una célula muy difícil de criopreservar por los métodos tradicionales de congelamiento (Arav et al., 1996). A la fecha se han logrado vitrificar ovocitos de varias especies animales: Kasai et al. (1979) vitrificaron ovocitos de rata y ovino, Aono et al. (2003) de ratón, Dinnyés et al., (2000); Giulia et al., (2017); Punyawai et al., (2015); Gutniski et al., (2013); Dalvit et al., (2012); Vajta et al., (1998); Hyttel et al., (2000); Vieira et al., (2002) en la vaca, Choi et al., (2017) en la yegua; Nagashima et al., (1996); Rojas et al. (2004); Somfai et al., (2014) en la cerda y Ruiz et al., (2011, 2013) en la alpaca. Sin embargo, los protocolos de vitrificación establecidos para una especie son difíciles de adaptar a otra especie debido a las diferencias en el tamaño del ovocito, a su sensibilidad al enfriamiento y a los crioprotectores (revisado por Shaw et al., 2000) y al contenido de gotas de lípidos característicos de algunas especies como el ovocito porcino (Somfai et al., 2009; Zhou et al., 2009).

Otros factores a considerar en el proceso de vitrificación son los estadios de maduración meiótica de los ovocitos, los cuales también pueden influir en su capacidad para sobrevivir a este procedimiento de conservación. La vitrificación de ovocitos en estadios de vesícula germinal podría tener ventajas ya que los microtúbulos aún no están organizados en forma de huso y el material genético está dentro del núcleo protegido por la membrana nuclear. Sin embargo, los índices de supervivencia de los ovocitos vitrificados en vesícula germinal son todavía muy bajos en el vacuno (Suzuki et al., 1996; Vieira et al., 2002), porcino (Didion et al., 1990; Isachenko et al., 1998). Por otro lado, Hochi et al., (1998) sugirieron que el proceso de congelación dañaría las membranas plasmáticas

o la comunicación intercelular entre el ovocito y las células del cúmulus perjudicando así su posterior maduración.

Para que un proceso de vitrificación tenga éxito, los ovocitos deben entrar en contacto directo con el nitrógeno líquido (-196 °C) lo antes posible. Por lo tanto, el tamaño de la muestra debe ser lo más pequeño posible para que la capa de vapor que se forma al contacto con el nitrógeno líquido sea mínima y la velocidad de congelación se vea incrementada (Liebermann y Tucker, 2002). Cuando las muestras biológicas son sumergidas dentro del nitrógeno líquido la velocidad de enfriamiento depende del contenedor, el volumen de la muestra, la conductividad térmica y la composición de la solución vitrificante (Yavin y Arav., 2007).

Vitrificación en Microgotas

La vitrificación por Microgotas descrita por Ruiz et al., (2011, 2013) consiste en dejar caer en nitrógeno líquido una gota de 2-3 μ l de solución vitrificante la cual contiene de 4-5 COCs. La gota al congelarse forma una esfera la cual es inmediatamente transferida a un tubo criogénico de 1 ml y es almacenada en nitrógeno líquido, con un proceso de enfriamiento y calentamiento mucho más eficiente ya que al tratarse de un sistema abierto permite la exposición directa de los ovocitos a los medios de calentamiento evitando daños provocados durante el calentamiento.

Dinnyés et al., (2000), reportaron la vitrificación de ovocitos bovinos en superficie sólida conocida también como vitrificación en microgotas, quienes evaluaron la capacidad meiótica de ovocitos vitrificados posterior a la activación, transferencia nuclear y fecundación *in vitro* y reportaron tasas de sobrevivencia superior al 80% y las tasas de blastocistos obtenidos de ovocitos vitrificados por este sistema superaron el 20%. Posteriormente Atabay et al., (2004), reportaron la vitrificación de ovocitos bovinos seguido de la transferencia nuclear interespecie, logrando obtener blastocistos de búfalo de pantano utilizando ovocitos vitrificados de bovino. Del mismo modo Somfai et al., (2014), obtuvieron el primer nacimiento de un lechón a partir de un ovocito vitrificado en superficie sólida modificada.

En la vitrificación en microgotas o superficie sólida, los ovocitos son expuestos a una solución de equilibrio por un periodo máximo de 15 minutos, seguidamente

los ovocitos son expuestos a una solución de vitrificación por un periodo de 20 a 30 segundos. Luego un grupo de 3 a 4 ovocitos contenidos en 2 μ l de esta solución es cargado con una micropipeta y finalmente los ovocitos son goteados directamente a un papel aluminio pre- enfriado flotando en nitrógeno líquido. La ventaja de este método de vitrificación radica en combinar pequeños volúmenes de vitrificación con exposición directa a nitrógeno líquido incrementando la velocidad de enfriamiento (Ruiz et al., 2011).

Vitrificación en Cryotech®

El sistema de vitrificación por Cryotech® fue descrito inicialmente por Dalvit et al., (2012) y Gutniski et al., (2013). Es un sistema de vitrificación por superficie que compone de una lámina fina de polipropileno (top) atado a una paleta de plástico y posee una tapa para proteger al ovocito de daños físicos y contaminación durante el almacenamiento en nitrógeno líquido. Este kit comercial posee soluciones de vitrificación y calentamiento estables a temperatura ambiente por un periodo de un año y por ser una técnica segura, repetible y de fácil aplicación ofrece altas tasas de sobrevivencia de ovocitos y embriones (Dalvit et al., 2012) Por otro lado, adicional a los beneficios de los crioprotectores contenidos en los medios de vitrificación convencional, el kit Cryotech® permite disminuir el volumen de vitrificación y acelerar la velocidad de calentamiento y enfriamiento, y la composición de los medios de vitrificación como la HPC, una proteína sintética altamente viscosa a bajas temperaturas, y la trehalosa, un disacárido que ayuda a la deshidratación parcial del ovocito previniendo la formación de cristales de hielo, y de esta manera garantiza los resultados de supervivencia superiores a los 99% de ovocitos y embriones viables posterior a la vitrificación. (Dalvit et al.,2012).

Gutnisky et al., (2013) vitrificaron embriones bovinos y obtuvieron crías nacidas después de la transferencia de embriones vitrificados/calentados con porcentajes de preñez y nacimientos similares a los obtenidos con embriones frescos.

Dalvit et al., (2012), obtuvieron 99% de tasas de sobrevivencia después de la vitrificación de ovocitos bovinos y los porcentajes de desarrollo embrionario hasta blastocistos posterior a un proceso de fecundación *in vitro* de estos ovocitos fueron similares a las tasas de desarrollo obtenidos en el grupo de ovocitos no vitrificados.

Viscosidad de las soluciones

El éxito de la vitrificación está supeditado a la interacción de varios factores como la viscosidad de los medios durante los procesos de enfriamiento, almacenamiento y atemperado, así como también a la estabilidad de los medios vitrificantes y al grado de toxicidad de los mismos. (Saragusty y Arav., 2011).

La viscosidad del medio en la cual los ovocitos son suspendidos es determinada por la concentración y el comportamiento de los crioprotectores y otros aditivos durante la vitrificación. A mayor concentración de crioprotectores, mayor es la temperatura de transición vítrea reduciendo así la formación de hielo intracelular y cristalización (Saragusty y Arav., 2011). Los crioprotectores así como otros aditivos poseen diferentes grados de toxicidad, tasa de penetración y temperatura de transición vítrea. La combinación de diferentes crioprotectores se ha usado frecuentemente con la finalidad de incrementar la viscosidad y reducir los niveles de toxicidad. Para vitrificar ovocitos de alpacas, Ruiz et al., (2011) utilizaron 4% de Etilenglicol (EG) en la solución de equilibrio (SVI) y 35% de EG en la solución de vitrificación (SVII), 4% PVP (polivinilpirrolidona) y 0.4M de Trehalosa. Estos autores obtuvieron tasas superiores a 50% de ovocitos morfológicamente normales y 39% de segmentación después de la activación partenogénica. Sin embargo, reportaron 31.3% de ovocitos dañados después de la exposición a las soluciones vitrificantes, demostrando que los ovocitos de alpaca son más susceptibles al efecto tóxico del EG que los ovocitos bovinos. Durante la vitrificación la viscosidad de las soluciones intra y extracelular incrementan progresivamente, este hecho disminuye la difusión del agua y las moléculas se ven inmovilizadas, en esta etapa, la solución se enfría rápidamente formando un vidrio en estado vítreo, no por cristalización de hielo, sino por incremento extremo de la viscosidad durante el enfriamiento (Fahy et al., 1984). En este sentido la vitrificación puede ser lograda aumentando la velocidad de enfriamiento y concentración de crioprotectores que permita una eliminación total de formación de hielo intra y extracelular (Liebermann et al., 2002). Sin embargo, el hecho de incrementar crioprotectores podría representar un riesgo de daño causado por la dificultad de lograr y controlar la velocidad de enfriamiento y atemperado (Yavin y Arav, 2007). Este hecho podría ser superado con el control de los tiempos de exposición, concentración de crioprotectores y volumen de vitrificación.

Volumen

Se ha demostrado que volúmenes pequeños tienen mayor probabilidad de vitrificación (Arav, 1992; Arav et al., 2002; Yavin y Arav., 2007), además permiten una mejor transferencia de calor logrando de esta manera altas tasas de enfriamiento. La vitrificación de ovocitos en volúmenes inferiores a 2 μ l, resultan en menos daños provocados por la toxicidad de crioprotectores. (Saragusty y Arav, 2011). Con la finalidad de minimizar el volumen de las soluciones de vitrificación se han desarrollado dos técnicas: técnicas de superficie y técnicas de tubo.

Las técnicas de superficie presentan la ventaja de que el tamaño de la gota (0.1- 0.2 ul) que contiene al ovocito puede ser controlado, y se pueden lograr altas tasas de congelamiento y de atemperado. Ejemplos de este sistema son: mallas de microscopía electrónica (Steponkus et al.,1990; Martino et al.,1996), microgotas (Arav, 1992; Arav y Zeron, 1997; Dinnyés et al., 2000, Yavin y Arav, 2001; Ruiz et al., 2013), Cryotop (Hamawaki et al., 1999; Kuwayama y Kato, 2000), Cryoloop (Lane et al., 1999a, 1999b), Hemi - pajuelas (Vanderzwalmen et al., 2000), malla de nylon (Matsumoto et al., 2001), Cryoleaf (Chian et al., 2005), vitrificación cubierta directa (Chen et al., 2006), vitrificación en espátula (Tsang y Chow, 2009), Cryo-E (Petyim et al., 2009), hoja de plástico (Sugiyama et al., 2010) y Cryotech® (Gutnisky et al., 2013).

Los sistemas de tubo tienen la ventaja de lograr altas tasas de congelamiento en sistemas cerrados, haciéndolos más seguros y de fácil manipulación. Destacan en estos sistemas: pajuela estirada (Rall y Fahy, 1985), pajuela estirada abierta (OPS) (Vajta et al., 1997, 1998), pajuela estirada cerrada (PEC, Chen et al., 2001), flexipet-denuding pipette (Liebermann et al., 2002), OPS super fina (Isachenko et al., 2000), CryoTip (Kuwayama et al., 2005), Tip de pipeta (Sun et al., 2008), dispositivo de vitrificación de alta seguridad (Camus et al., 2006), pajuela estirada sellada (Yavin et al., 2009), Cryo Pipeta (Portmann et al., 2010).

Crioprotectores

Los crioprotectores son sustancias altamente solubles en agua y con capacidad de formar enlaces de hidrógeno estables con moléculas de agua, disminuyen el punto de congelación de cualquier solución en la que estén incluidos y son

tóxicos a altas concentraciones, por lo que deben tener bajo peso molecular para entrar fácil y rápidamente a la célula y ofrecer el máximo efecto protector. Además, un crioprotector debe inhibir la acción enzimática, disminuyendo e inclusive eliminando la actividad de radicales libres responsables de lisis celular, antes, durante y después de la vitrificación y atemperado (Palma, 2001).

Crioprotectores penetrantes

Los agentes penetrantes son, por lo general, alcoholes de bajo peso molecular (PM) permeables a través de la membrana celular, que protegen a la célula de las lesiones producidas por las congelaciones a baja velocidad. Los crioprotectores penetrantes reemplazan osmóticamente el agua intracelular antes y durante el congelamiento, disminuyendo el punto de congelación del agua, lo cual combinado con una lenta tasa de enfriamiento disminuye la formación de cristales de hielo (Matthes et al., 1980). Entre los más comunes existen, G, EG, DMSO y PROH. Si bien la célula es permeable a estos agentes, su permeabilidad nunca es de la misma magnitud que la del agua.

Los crioprotectores permeables como EG y DMSO son ampliamente usados en protocolos de vitrificación de ovocitos de humanos y animales, aunque el EG tiene menor capacidad vitrea (Mullen et al., 2008), tendría baja toxicidad y una mayor difusión celular (Bautista y Kanagawa, 1998; Kuleshova et al., 1999a; Orief et al., 2005), y posee alta compatibilidad con otros crioprotectores (Bautista y Kanagawa, 1998). El EG es el crioprotector más comúnmente usado en la vitrificación de ovocitos humanos (Coello et al., 2016; Kasapi et al., 2017). Estos autores evaluaron 7.5% EG y DMSO en el equilibramiento y 15 y 20% EG y DMSO en la vitrificación y reportaron tasas variables de 40 a 60% de sobrevivencia. En ovocitos de ratón (Zhang et al., 2016), obtuvieron 93.8% de ovocitos vivos y 50% de blastocitos posterior a la FIV de ovocitos vitrificados en 7.5 y 10 % de DMSO y EG. En porcinos (Somfai et al., 2014) evaluaron 17.5% de EG sobre la viabilidad de ovocitos vitrificados y obtuvieron 66% de ovocitos viables. En bovinos (Elsden et al., 1982; Nibart y Humblot, 1997; Dinnyés et al., 2000; Giulia et al., 2017; Punyawai et al., 2015; Ortiz et al., 2016), evaluaron concentraciones de 4 a 10% EG y DMSO en el equilibramiento y concentraciones de 15 a 35% EG y 15 a 20% DMSO para la vitrificación de ovocitos, los resultados de sobrevivencia posterior al atemperado fueron variables. En el mejor de los casos los porcentajes de sobrevivencia superaron los 90% de ovocitos vivos después

del atemperado pero las tasas de desarrollo meiótico posterior al atemperado fueron inferiores a 40% evidenciando que el proceso de vitrificación ejerce daños irreversibles sobre los ovocitos y compromete su posterior desarrollo. En alpacas Ruiz et al., (2013), evaluaron diferentes concentraciones de EG en la solución de equilibrio (2, 4, 6 y 8%) y en la de vitrificación (25, 35 y 45%), indicando que porcentajes inferiores a 4% de EG en la solución de equilibrio y 25% de EG en la solución de vitrificación mejoraron los porcentajes de ovocitos vivos y tasas de segmentación después de la activación partenogenética. Sin embargo, porcentajes superiores a 6% de EG en la solución de equilibrio y 35% de EG en la solución de vitrificación fueron perjudiciales sobre las tasas de viabilidad y segmentación. Además, Ruiz et al., (2011) demostraron la toxicidad del EG sobre los ovocitos de alpaca después de un experimento de exposición a 35% de EG donde el 31.1% de ovocitos expuestos resultaron dañados.

Crioprotectores no penetrantes

Los crioprotectores no penetrantes son azúcares y otras macromoléculas los cuales, por el gran tamaño que presentan, no entran a la célula o lo hacen con extrema dificultad. Estas sustancias reducen las fuerzas iónicas fuera de la célula e influyen en la formación de cristales de hielo. Conformado por proteínas de suero y polímeros, estos crioprotectores son importantes en la composición de las soluciones de vitrificación por su influencia en la viscosidad, por ser promotores de formación vítrea y disminuir la toxicidad de los medios ya que su adición permite bajar las concentraciones de crioprotectores permeables sin comprometer sus propiedades de vitrificación (Bautista y Kanagawa, 1998; Liebermann et al., 2002; Pegg, 2005). A su vez, ayudan a la reparación de membranas dañadas, además de prevenir la ruptura de la ZP durante el enfriamiento, promueven el desarrollo *in vitro* del embrión y la eclosión embrionaria (Kane, 1983). Estas macromoléculas son altamente viscosas a temperaturas bajas, lo cual impide que las moléculas de agua se unan con cristales de hielo (Sutton, 1991). Además, ayudan a la formación de un estado vítreo estable (Bautista y Kanagawa, 1998). La presencia de proteínas en el medio de vitrificación es importante para estabilizar la membrana celular y las enzimas (Carpenter y Crowe, 1988). El potencial uso de la HPC como un suplemento macromolecular en las soluciones de vitrificación de ovocitos y embriones ha sido previamente descrita (Inoue, 2012; Kuwayama, 2013; Mori et al., 2015). Inoue, (2012) evaluó por primera vez el uso de HPC como un sustituto para

proteínas y derivados de suero animal en la vitrificación de ovocitos humanos, no encontrando diferencias en las tasas de sobrevivencia al ser comparados con medios de vitrificación con suplementos de suero. Estos hallazgos han sido confirmados por recientes estudios realizados en ratón y blastocistos humanos (Mori et al., 2015; Coello et al., 2016). La eficiencia de esta macromolécula en la vitrificación de ovocitos y embriones bovinos también ha sido evaluada por Dalvit et al., (2012) quienes obtuvieron tasas de sobrevivencia superior a los 90% después de la vitrificación de ovocitos bovinos.

El uso de SFB y BSA como suplemento de proteína en los medios de vitrificación ha sido ampliamente usado durante la vitrificación de ovocitos de alpacas Ruiz et al., (2011, 2013), porcinos (Somfai et al., 2014), bovinos (Dinnyés et al., 2000; Giulia et al., 2017; Punyawai et al., 2015; Dalvit et al., 2012). La proporción del SFB en los medios de vitrificación ha sido variable desde un 0.01% hasta 20% de SFB en los medios de vitrificación, equilibramiento y atemperado.

Otro de los crioprotectores no penetrantes como la trehalosa ha sido usado como suplemento en los medios de vitrificación por su capacidad de preservar la integridad de membrana en actividades bajo el nivel del agua (Hotamisligil et al., 1996) y puede reducir la toxicidad de los crioprotectores permeables usados en la vitrificación a medida que recubren la membrana externa mediante la formación de enlaces de hidrógeno con fosfolípidos de la membrana (Anchordoguy et al., 1987). Además, la adición de este ayuda a la deshidratación, disminuyendo el riesgo de cristalización intracelular (Courbiere et al., 2009). Los azúcares previenen la entrada acelerada del agua hacia el interior de la célula durante el atemperado, por ello la importancia del uso de los sacáridos como crioprotectores permeables y no permeables. El uso de la trehalosa o sucrosa en las soluciones de vitrificación de ovocitos, así como en el de atemperado ha sido frecuentemente reportado en la vitrificación de ovocitos humanos (Kasapi et al., 2017; Coello et al., 2016), en bovino (Dinnyés et al., 2000; Giulia et al., 2017; Punyawai et al., 2015), porcinos (Somfai et al., 2014) y en alpacas (Ruiz et al., 2011, 2013). La adición de azúcares como sucrosa, trehalosa, rafinosa y otros azúcares contribuyen a los resultados de la vitrificación (Kuleshova et al., 1999; Sutton., 1991). Sin embargo, es importante tener en cuenta que, al igual que el CPA permeable, los azúcares también pueden causar daño osmótico cuando se usan en altas concentraciones (Isachenko et al., 2001).

Efectos del enfriamiento y la vitrificación sobre las estructuras ovocitarias.

La mayoría de los estudios sobre los efectos del enfriamiento y congelación sobre los ovocitos mamíferos se limitan principalmente a los efectos de éste en la morfología, la citología y la competencia de un desarrollo embrionario posterior de los ovocitos enfriados o criopreservados y, más concretamente, de los estadios meióticos en los que los ovocitos se encuentren al momento de ser sometidos a procesos de criopreservación (Park et al., 1997). Cuando los ovocitos son sometidos a temperaturas inferiores a las fisiológicas y éstas se elevan nuevamente a 37 °C, los ovocitos sufren una serie de cambios físicos y fisiológicos. No obstante, Arav et al., (1996) y Park et al., (1997) demostraron que los mayores daños se producen entre +15 y -15 °C y temperaturas entre +30 y 0 °C podrían comprometer la integridad de la membrana, el metabolismo celular, el citoesqueleto y la capacidad celular de controlar y reparar los daños producidos por los radicales libres. Por otro lado, debajo de los 0 °C suponen un alto riesgo de formación de hielo intracelular el cual puede provocar un daño irreparable en la célula (Trad et al., 1999). El daño sobre estructuras ovocitarias causado por la vitrificación estaría relacionado con el estadio de maduración en el cual éstos son vitrificados. Egerszegi et al., (2013), evaluaron las tasas de sobrevivencia y desarrollo posterior de ovocitos porcinos vitrificados en dos estadios (VG y MII), y reportaron altas tasas de sobrevivencias después de la vitrificación para el grupo de ovocitos vitrificados en MII en comparación a las tasas de sobrevivencia del grupo de ovocitos vitrificados en VG. Sin embargo, las tasas de maduración fueron similares en ambos grupos, el grupo de ovocitos vitrificados en VG tuvieron una mejor distribución del uso y de la integridad de F-actina. Estos hallazgos demuestran que la vitrificación de ovocitos en estadios de VG son más ventajosas en términos de segmentación y desarrollo a blastocistos comparados con la vitrificación de ovocitos en MII. En otros estudios (Jee Bc et al., 2009; Mandelbaum et al., 1998) reportaron tasas de MIV inferiores después de la vitrificación de ovocitos en estadio de VG que en aquellos vitrificados en MII, vitrificar ovocitos en estadios tempranos podría comprometer las tasas de segmentación obtenidas después de un proceso de fecundación *in vitro* de ovocitos vitrificados. Por otro lado, en ovocitos vitrificados en MII, la probabilidad de desnudar ovocitos durante los procesos de vitrificación y atemperado se ve significativamente reducida, ya que los ovocitos vitrificados en VG requieren mantener intacto la comunicación celular entre ovocitos y células del cumulus para garantizar una MIV exitosa (Brambillasca et al., 2013).

VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Ruiz (2009), vitrificó ovocitos maduros de alpaca con el método de vitrificación en microgotas. Para cumplir con este objetivo se realizaron 6 experimentos los cuales generaron 4 capítulos. En el primer capítulo el objetivo fue establecer la técnica de vitrificación en microgotas usando como modelo ovocitos bovinos. Los resultados demostraron que es posible obtener ovocitos bovinos morfológicamente normales post-vitrificación y además que son fisiológicamente normales al ser capaces de segmentarse en altas tasas e incluso desarrollar hasta blastocisto. En el segundo capítulo el objetivo fue establecer un protocolo de activación química para ovocitos de alpaca y llama para la producción de embriones partenogenéticos. Se encontró que los ovocitos de ambas especies respondieron a la activación química y se obtuvieron altas tasas de segmentación lográndose el desarrollo hasta blastocisto sin diferencias entre ambas especies demostrando que es posible la producción *in vitro* de embriones partenogenéticos utilizando ovocitos de alpaca y llama. En el tercer capítulo el objetivo fue aplicar el método de vitrificación establecido en bovinos para evaluar su efecto en la viabilidad de ovocitos de alpaca activados químicamente para la producción de embriones partenogenéticos. Los resultados evidenciaron que es posible obtener ovocitos de alpaca morfológicamente normales luego del proceso de vitrificación/descongelación por el método de superficie sólida y que los ovocitos de alpaca eran fisiológicamente viables post-descongelación al ser capaces de segmentarse. Asimismo, se demostró que los ovocitos de alpaca son sensibles a la exposición en etilenglicol y que la criopreservación afecta el desarrollo de los embriones producidos a partir de ovocitos vitrificados de alpaca. En el cuarto capítulo se evaluaron diferentes concentraciones de etilenglicol en la solución de equilibrio y de vitrificación y diferentes tiempos de exposición en la solución de vitrificación de ovocitos de alpaca madurados *in vitro*. Demostrando que la exposición en etilenglicol hasta un 4% en la solución de equilibrio y 35% en la solución de vitrificación no afecta el desarrollo embrionario. Asimismo, la vitrificación de ovocitos de alpaca utilizando 25% y 35% de etilenglicol y exponiendo los ovocitos por 15 y 30 segundos en la solución de vitrificación fue más efectiva al tener mayores tasas de segmentación incluso se logró el desarrollo de blastocistos.

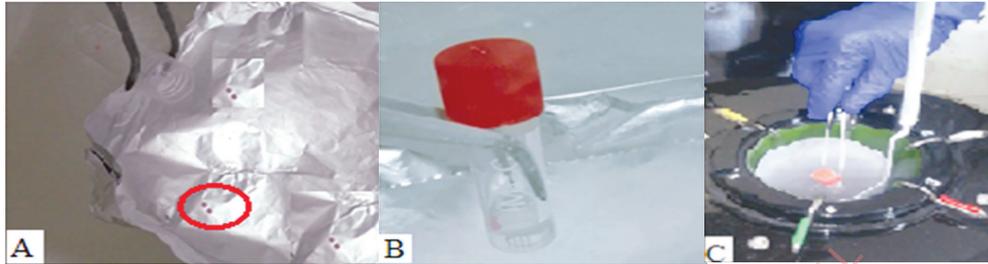


Figura 1. Vitrificación de ovocitos de alpaca en microgotas: A) Microgotas vitrificadas conteniendo ovocitos B) Microgotas vitrificadas en vial criogénico C) Criovial conteniendo microgotas en tanque de nitrógeno mantenidos por 24h.

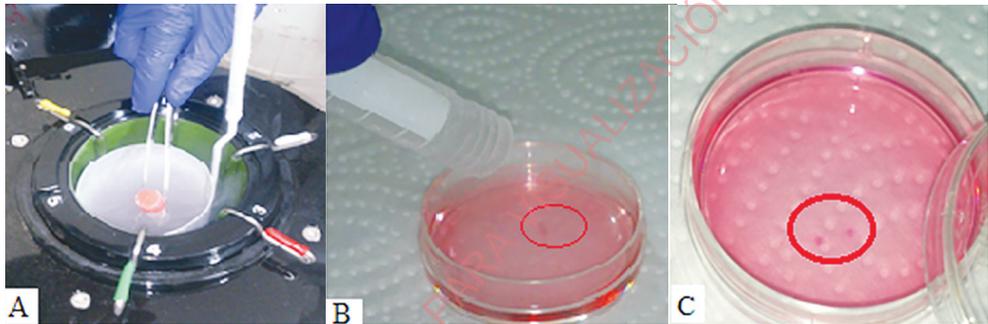


Figura 2. Atemperado de ovocitos de alpaca vitrificados por Microgotas: A) Criovial conteniendo microgotas vitrificados. B y C) Atemperado de ovocitos vitrificados en microgotas.

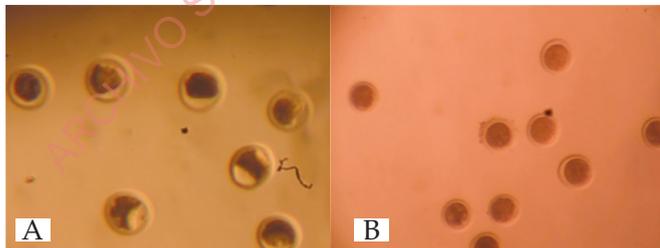


Figura 3. A) Ovocitos de alpaca deshidratados inmediatamente después del descongelamiento B) Ovocitos de alpaca rehidratados 5 minutos después de mantenerse en medio de atemperamiento.

Por otro lado, Landeo (2019) obtuvo blastocistos de alpaca mediante fecundación *in vitro* a partir de complejo ovocito cúmulus (COCs) vitrificados por dos técnicas: Cryotech® y Microgotas. Para lo cual 1094 COCs de categoría I y II fueron recuperados de ovarios de matadero, y madurados *in vitro* por 36 horas. Posterior a la maduración *in vitro* los COCs fueron aleatoriamente distribuidos en tres grupos, vitrificados: VM (n=250) y VC (n=244), expuestos: EM (n=200) y EC (n=200) y no vitricado y sin exponer NVE (n=200). La FIV fue realizada 24

horas después de la criopreservación de los COCs utilizando espermatozoides epididimarios. Las tasas de división celular y mórulas obtenidas a partir de ovocitos vitrificados con Cryotech® (VC) y Microgotas (VM) fueron (16.8 y 12.5%) y (13.5 y 8.25%) respectivamente y no evidenciaron diferencias estadísticas significativas entre ambos. Y las tasas de división celular y mórulas (41.5 y 34.5%) obtenidas a partir de COCs expuestos a Cryotech® (EC) fueron similares a las tasas de división celular y mórulas (61.3 y 50%) obtenidas a partir de COCs NVE. Las tasas de blastocitos tempranos (4.5, 10.3 y 4.0%) obtenidos a partir de COCs VM, VC y EM fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) que las tasas de blastocitos tempranos (23.8 y 27.3%) obtenidos a partir de COCs EC y NVE respectivamente. Las tasas de blastocistos expandidos (20.5 y 21.8%) obtenidos a partir de COCs EC y NVE respectivamente fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) que las tasas de blastocistos expandidos (1,5%) obtenidos a partir de COCs EM. Los COCs vitrificados con VM y VC no alcanzaron desarrollar hasta los estadios de blastocistos expandidos ni eclosionados. Las tasas de blastocistos eclosionados (0.45, 9.9 y 21.1%) obtenidos a partir de COCs EM, EC y NVE respectivamente fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$).

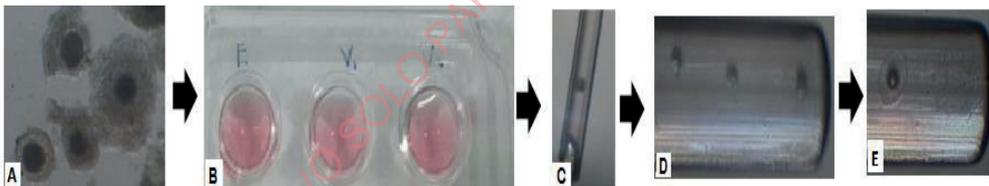


Figura 4. Vitrificación de ovocitos de alpaca en Cryotech®: A) Ovocitos de alpaca madurados *in vitro* 36 h. B) Solución de equilibramiento Es, Solución de Vitrificación V1 y V2 C) Ovocito de alpaca en un capilar de vidrio estirado D) Ovocitos de alpaca distribuidos sobre una lámina de plástico (Top). E) Ovocito de alpaca sobre una lámina de plástico previo a la vitrificación.

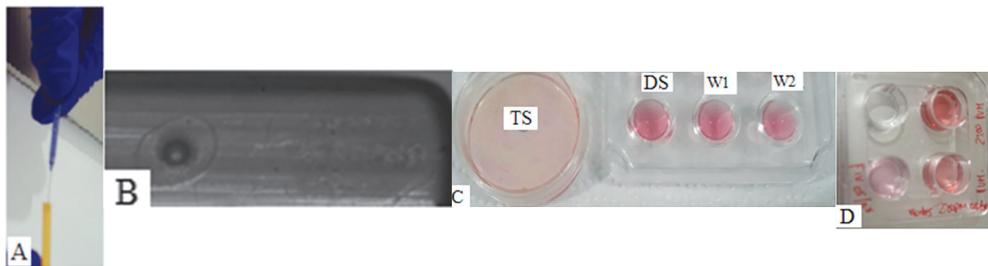


Figura 5. Atemperado de ovocitos vitrificados por Cryotech®: A y B) Paleta de plástico (top) conteniendo ovocitos vitrificados. C) Medio de atemperado TS, DS, WS1 y WS2 D) Placa de 4 pocillos con medio de lavado y fecundación *in vitro*.

CONCLUSIONES

Se ha demostrado que los ovocitos de alpaca son sensibles al congelamiento y que el etilenglicol tiene efecto en la sobrevivencia de los ovocitos. Es posible obtener desarrollo hasta blastocistos tempranos a partir de COCs vitrificados, y con Cryotech® se obtienen mayores porcentajes de desarrollo a blastocistos tempranos que con Microgotas. Es necesaria mayor investigación para optimizar un protocolo para vitrificar ovocitos de alpacas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albarracín J, Morató R, Rojas C, Mogas, T., 2005, Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of *in vitro* matured prepubertad and adult bovine oocytes. *Theriogenology*, 63: 890-901.
- Anchordoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH. 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*, 24(4):324-331.
- Aono N, Naganuma T, Abe Y, Hara K, Sasada H, Sato E, Yashida H, 2003. Successful production of blastocysts following ultrarapid vitrification with step-wise equilibration of germinal vesicle-stage mouse oocytes. *Reprod Dev*, 49(6): 501-506.
- Atabay E, Takahashi Y, Katagiri S, Nagano M, Koga A, Kanai Y. 2004. Vitrification of bovine oocytes and its application to intergeneric somatic cell nucleus transfer. *Theriogenology*, 61: 15-23.
- Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua 2002. New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187: 77-81.
- Arav A, Zeron Y. 1997. Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop zise technique (MDS) is affected by the composition and concentration of vitrification solution and by the cooling conditions. *Theriogenology*, 47, 341.
- Arav A, Zeron Y, Leslie SB, Behboodi E, Anderson Gb, Crowe JH. 1996. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. *Cryobiology*, 33(6): 589-599.
- Arav A. 1992. Vitrification of oocytes and embryos. In *New Trends in Embryo Transfer*. Eds Lauria and F Gandolfi. Cambridge: Portland Press, 1, 255-264.

- Bautista JN, Kanagawa 1998. Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: Ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. *Jpn J Vet, Res* 45: 183-191.
- Brambillasca F, Guglielmo MC, Coticchio G, Mignini M, Dal Canto M, Fadini R. 2013. The current challenges to efficient immature oocyte cryopreservation. *J Assist Reprod Genet*, (12):1531-9.
- Camus A, Clairaz P, Ersham A, Van Kappel AL, Savic G, Staub C. 2006. Principio de la vitrificación: técnicas comparativas. The comparison of the process of five different vitrification devices. *Gynecologie, Obstétrique and Fertilité*, 34: 737-745.
- Carpenter J, Crowe J. 1988. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology*, 25: 244-255.
- Coello A, Campos P, Remohi j, Meseguer M, Cobo A. 2016. A combination of hydroxypropyl cellulose and trehalose as supplementation for vitrification of human oocytes: a retrospective cohort study. *J Assist Reprod Gent*, 33(3):413-421.
- Courbiere B, Baudot A, Mazoyer C, Salle B, Lornage J. 2009. La vitrification: technique d'avenir pour la cryoconservation ovarienne? Bases physiques de cryobiologie, avantages et limites. *Gynecol, Obstet. Fétil*, 37: 803-813.
- Chen SU, Chien CL, Wu MY, Chen TH, Lai SM, Lin CW, Yang YS. 2006. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. *Human Reproduction*, 21: 2794-2800.
- Chen SU, Lien YR, Cheng Y, Chen HF, Ho HN, Yang YS. 2001. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Human Reprod.*, 16: 2350-2356.
- Chian RC, Son WY, Huang JY, Cui SJ, Buckett WM, Tan SL. 2005. High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report. *Fertility and Sterility*, 84: 36 (abstract).
- Choi YH, Hinrichs K. 2017. Vitrification of *in vitro*-produced and *in vivo*-recovered equine blastocysts in a clinical program. *Theriogenology*, 1, (87):48-54.
- Cristofanelli S, Antonini A, Torres D, Polidori P, Renieri C. 2004. Meat and carcass quality from Peruvian llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama pacos*). *Meat Sci* 66: 589-593.

- Dalvit G, Gutnisky C, Alvarez G, Cetica P. 2012. Vitrification of bovine oocytes and embryos. *Cryobiol.* 7-12.
- Didion BA, Pomp D, Martin MJ, Homanics GE, Markert CL. 1990. Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicles stage. *Animal Science*, 68(9): 2803-2810.
- Dinnyés A, Dai Y, Jiang S, Yang X., 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, 63: 513-518.
- Dobrinsky JR. 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, 45 (1): 17-26.
- Elsden RP, Seidel GE, Takeda Jr, Farrand GD. 1982. Field experiments with-thawed bovine embryos transferred nonsurgical. *Theriogenology*, 17: 1-10.
- Egerszegi I, Somfai T, Nakai M, Tanihara F, Noguchi J, Kaneko H, Nagai T, Rátky J, Kikuchi K. 2013. Comparison of cytoskeletal integrity, fertilization and developmental competence of oocytes vitrified before or after *in vitro* maturation in a porcine model. *Cryobiology*, 67(3)287-292.
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angel CA, Meryman HT, 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21(4): 407-426.
- FAO 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos. Proyecto de cooperación técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la Región Andina. TCP/RLA/2914. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y alimentación. Oficina Regional para América Latina y el Caribe.
- Giulia R, Carolina De C, Gianluigi Z, Marcello R, Maria S, Rosa C, Antonio S, Bianca G. 2017. Raman-microscopy investigation of vitrification-induced structural damages in mature bovine oocytes, *Plos one*, 12(5):177-677.
- Gutnisky C, Alvarez GM, Cetica PD, Dalvit GC. 2013. Evaluation of the Cryotech® vitrification Kit for bovine embryos. *Cryobiology*, 67: 391-393.
- Hamawaki A, Kuwayama M, Hamano S. 1999. Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. *Theriogenology*, 51: 165 (abstract).
- Hochi S, Ito K, Hirabayashi M, Ueda M, Kimura K, Hanada A. 1998. Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified – warmed bovine oocytes. *Theriogenology*, 49 (4):787-796.

- Hotamisligil S, Toner Powers RD. 1996. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biol Reprod*, 55 (1): 161-168.
- Hyttel P, Vajta G, Callesen H. 2000. Vitrification of bovine oocytes with the open pulled Straw method: ultrastructural consequences. *Mol Reprod Dev*, 56(1): 80-88.
- Inoue F. 2012. Hydroxypropyl cellulose as a macromolecular supplement for cryopreservation of bovine oocytes and blastocysts and human oocytes. *Low Temp Med*, 2012:38.
- Isachenko V, Alabart JL, Nawroth F, Isachenko E, Vajta G, Folch. 2001. The open pulled Straw vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect orf rapid cooling or rapid thawing or both?. *Cryo Letters*, 22(3): 157-162.
- Isachenko V, Alabart JL, Isachenko E, Bezugly N, Michelmann HW, 2000. Ultrarapid Freezing and storage of rat embryos in an electric refrigerator at-130°C without liquid cryo-agents, with ultra-short exposure in the freezing médium and direct rehydration after thawing. *Cryo Letters*, 21:13-18.
- Isachenko V, Soler C, Isachenko E, Perez-Sanchez F, Grishchenko V. 1998. Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology*, 36(3): 250-253.
- Jee BC, Chen HY, Chian RC, Suh CS, Kim SH, Moon SY. 2009. Vitrification of immature mouse oocytes using stepwise equilibration before or after *in vitro* maturation. *Fertil Steril*, 92(3):1153-1157.
- Kane M. 1983. Variability in different lots of commercial BSA affects cell multiplication and hatching of rabbit blastocysts in culture. *Reprod Fert*, 69:555-558.
- Kasai M, Irinati A, Chang MC. 1979. Fertilization *in vitro* of rat ovarian oocytes after freezing and thawing. *Biol Reprod*, 21: 839-844.
- Kasapi E, Asimakopoulos B, Chatzimeletiou K, Petousis S, Panagiotidis Y, Prapas N, Nikolettos N, 2017. Vitrification of Human Germinal Vesicle Oocytes: before or after *in vitro* Maturation. *Fértil steril*, (11) 85:92.
- Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO, Shaw JM. 1999a. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based

- solution and have low toxicity to embryos and oocytes, *Cryobiology*, 38: 119-130.
- Kuleshova L, Gianoroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. 1999b. Birth following vitrification of a small number of human oocytes. *Hum. Rep* 14(12): 3077-3079.
- Kuwayama M. 2013. Efficiency of non-protein solutions using hydroxypropyl cellulose on survival of bovine and human oocytes and embryos after vitrification. *Fertil Steril*, 10:174.
- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. 2005. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reproductive Biomedicine Online*, 11: 608–614.
- Kuwayama M, Kato O. 2000. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *Journal of Assisted, Reproduction and Genetics*, 17: 477
- Landeo L. 2019. Producción de embriones de alpacas por fecundación *in vitro* a partir de ovocitos vitrificados. Tesis de Magister. Universidad de Buenos Aires.
- Lane M, Forest KT, Lyons EA, Bavister BD. 1999a. Live births following vitrification of hamster embryos using a novel containerless technique, *Theriogenology*, 51: 167 (abstract).
- Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK, Phil D. 1999b. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertility and Sterility*, 72: 1073–1078.
- Liebermann J. 2009. Vitrification of human blastocysts: an update. *Reproductive Biomedicine Online*, 19, 105–114.
- Liebermann J, Tucker MJ. 2002. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction*, 124 (4):483-489.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biology of Reproduction*, 54 1059–1069.
- Massip A, P Mermillod, A Dinnyes. 1995. Morphology and biochemistry of *in vitro* produced bovine embryos: Implications for their cryopreservation. *Hum Reprod* 10, 3004-3011.

- Matsumoto H, Jiang JY, Tanaka T, Sasada H, Sato E. 2001. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology*, 42: 139–144.
- Matthes G, Hackensellner H, Jentsch K, Ehme O. 1980. Zum supportiven Effect von striumselenit und selenome im Rahmen der Kryokonservierung. *Dtsch Gesundheitswes*, 35: 1275-1278, Cit. Por Fahy, 1986.
- Mandelbaum J, Beláisch-Allart J, Junca AM, Antoine JM, Plachot M, Alvarez S, Alnot MO, Salat-Baroux J. 1998. Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes. *Human Reprod*, 3:161-174.
- Mullen SF, Li M, Li Y, Chen ZJ, Critser JK. 2008. Human oocyte vitrification: the permeability of metaphase II oocytes to water and ethylene glycol and the appliance toward vitrification. *Fertil Steril*, 89 (6):1812-25.
- Mori C, Yabuuchi A, Ezoe K, Murata N, Takayama Y, Okimura T. 2015. Hydroxypropyl cellulose as an option for supplementation of cryoprotectant solutions for embryo vitrification in human assisted reproductive technologies, *Reprod Biomed Online*, 30:613–621.
- Nagashima H, Kuwayama M, Grupen CG, Ashman RJ, Nottle MB. 1996. Vitrification of porcine early cleavage stage embryos and oocytes after removal of cytoplasmic lipid droplets, *Theriogenology*, 45:180.
- Nibart M, Humblot P. 1997. Pregnancy rates following direct transfer of glycerol sucrose or ethylene glycol cryopreserved bovine embryos. *Theriogenology*, 47: 371. Abstract.
- Orief Y, Kikoletto N, Al-Hassani S. 2005. Cryopreservation of two pronuclear stage zygotes. *Rev Gynaecol Prac*, 5: 39-44.
- Ortiz N, Smits K, Piepers S, Van den Abbeel E, Woelders H, Van Soom A. 2016. Role of cumulus cells during vitrification and fertilization of mature bovine oocytes: Effects on survival, fertilization, and blastocyst development. *Theriogenology*, 86:635-641.
- Palma G. 2001. *Biotechnology de la Reproducción*. Ed. INTA. Balcarce. Argentina.
- Park SE, Son WY, Lee Sh, Lee KA, Ko JJ, Cha KY. 1997. Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured *in vitro* after cryopreservation at the germinal vesicle stage. *Fertil Steril*, 68(5):920-926.
- Pegg DE, 2005. The role of vitrification technique of cryopreservation in reproductive medicine. *Hum Fertil*, 8: 231-239.

- Petyim S, Makemahar O, Kunathikom S, Choavaratana R, Laokirkkiat P, Penparkkul K. 2009. The successful pregnancy and birth of a healthy baby after human blastocyst vitrification using Cryo-E, first case in Siriraj Hospital. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 92: 1116–1121.
- Portmann M, Nagy ZP, Behr B. 2010. Evaluation of blastocyst survival following vitrification/warming using two different closed carrier systems. *Human Reproduction*, 25: 261 (abstract).
- Punyawai K, Anakkul N, Srirattana K, Aikawa Y, Sangsritavon S, Nagai T, Imai K, Parnpa R. 2015. Comparison of Cryotop and micro volume air cooling methods for cryopreservation of bovine matured oocytes and blastocysts. *Journal of Reproduction and Development*, (5):431-437.
- Rall WF, Fahy GM. 1985. Ice free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees by vitrification. *Nature*, 313(6003): 573-575.
- Rojas C, Palomo MJ, Albarracin JL, Mogas T. 2004. Vitrification of immature and *in vitro* matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. *Cryobiology*, 49:211-220.
- Ruiz J, Landeo L, Mendoza J, Artica M, Correa J, Silva E, Miragaya M, Ratto MH. 2013. Effect of ethylene glycol concentration and time of exposure in the equilibration and vitrification solutions. *Animal Reprod. Science*, 143: 72-78.
- Ruiz J, Landeo L, Artica M, Ratto M, Correa J. 2011. Chemical activation of alpaca oocytes vitrified after *in vitro* maturation. *RIVEP*, 22(3):206-212.
- Ruiz J. 2009. Vitrificación de ovocitos de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis de doctorado en Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile.
- Salvá BK, Zumalacárregui JM, Figueira AC, Osorio MT, Mateo J. 2009. Nutrient composition and technological quality of meat from alpacas reared in Peru. *Meat Sci*, 82: 450-455.
- Saragusty J, Arav A. 2011. Current progress in oocytes and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 141: 1-19.
- Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53(1): 59-72.
- Somfai S, Yoshioka K, Fuminori T, Kaneko H, Noguchi J, Kashiwazaki N, Nagai T, Kikuchi K. 2014. Generation of Live Piglets from Cryopreserved Oocytes

- for the First Time Using a Defined System for *in vitro* Embryo Production. Plos One, 20:9
- Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Nakai M, Maedomari N. 2009. Live piglets derived from *in vitro*-produced zygotes vitrified at the pronuclear stage. Biol Reprod, 80: 42-49.
- Steponkus PL, Myers SP, Lynch DV, Gardner L, Bronshteyn V, Leibo SP, Rall WF, Pitt Re, Lin TT, MacIntyre RJ. 1990. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos, Nature, 345: 170–172.
- Sugiyama R, Nakagawa K, Shirai A, Sugiyama R, Nishi Y, Kuribayashi Y, Inoue M. 2010. Clinical outcomes resulting from the transfer of vitrified human embryos using a new device for cryopreservation (plastic blade). Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 27: 161–167.
- Suzuki T, Boediono A, Takagi M, Saha S, Sumantri C. 1996. Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicles bovine oocytes by one-step dilution method *in vitro*. Cryobiology, 33 (5):515-524.
- Sun X, Li Z, Yi Y, Chen J, Leno GH, Engelhardt JF. 2008. Efficient term development of vitrified ferret embryos using a novel pipette chamber technique. Biology of Reproduction, 79: 832–840.
- Sutton RL, 1991. Critical cooling rates to avoid ice crystallization in solutions of cryoprotective agents. J. Chem. Soc., Faraday Trans, 87, 101–105.
- Trad FS, Toner M, Biggers JD. 1999. Effects of cryoprotectants and ice-seeding temperature on intracellular freezing and survival of human oocytes, Hum Reprod, 14(6): 1569-1577.
- Tsang WH, Chow KL. 2009. Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula, BioTechniques, 46: 550–552.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryo injuries of bovine ova and embryos. Molecular Reprod. and Development, 51: 53–58.
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. 1997. Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw (OPS) method. Acta Veterinaria Scandinavica, 38 349–352.
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C, Standaart V, Schoysman E. 2000. “*In vitro*” survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocysts after vitrification in a hemi-straw (HS) system, Fertility and Sterility. 74 S215–S216 (abstract).

- Vieira AD, Mezzalana A, Barbieri DP, Lehmkuhl RC, Rubin MI, Vajta G. 2002. Calves born after open pulled Straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology*, 45(1): 91-94.
- Wusteman MC, Pegg DE, Wang LH, Robinson MP. 2003. Vitrification of ECV304 cell suspensions using solutions containing Propane-1,2-diol and trehalose. *Cryobiology*, 46:1345-45.
- Yavin S, Arroyo A, Roth Z, Arav A. 2009. Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. *Human Reproduction*, 24: 797-804.
- Yavin S, Arav A. 2007. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*, 67:81-89.
- Yavin S, Arav A, 2001. Development of immature bovine oocytes vitrified by minimum drop size technique and a new vitrification apparatus (VIT-MASTER). *Cryobiology*, 43 331 (abstract).
- Zhang L, Xue X, Yan J, Yan LY, Jin XH, Zhu XH, He ZZ, Liu J, Li R, Qiao J. 2016. L-proline: a highly effective cryoprotectant for mouse oocyte vitrification. *Sci Rep*, 6:26326.
- Zhou GB, Li N. 2009. Cryopreservation of porcine oocytes: recent advances. *Mol Hum Reprod*. 15(5):279-285.

CAPÍTULO X

ACTIVACIÓN QUÍMICA DE OVOCITOS DE ALPACAS Y LLAMAS

Jaime Ruiz y Flor Castañeda

RESUMEN

Existen diferentes protocolos para activar ovocitos. Agentes físicos y químicos son utilizados para la activación de ovocitos de diferentes especies. Hasta el momento, la activación química es la única forma en que han sido activados ovocitos de alpacas y llamas. En los primeros estudios en camélidos sudamericanos, se utilizó la activación química para activar embriones de llamas producidos por transferencia nuclear e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Posteriormente en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica se han realizado diversos estudios con ovocitos de alpacas, que han permitido establecer el protocolo óptimo para activar ovocitos utilizando Ionomicina de Ca, DMAP y Citocalasina B, asimismo se encontró que se puede usar el etanol en forma alternativa para la activación química de ovocitos de alpaca, también se ha utilizado la activación química para evaluar el efecto de los crioprotectores sobre el desarrollo embrionario *in vitro* y para verificar la viabilidad de ovocitos de alpaca post descongelamiento.

INTRODUCCIÓN

La activación partenogenética de ovocitos no es una forma de reproducción natural en los mamíferos. Sin embargo, permite producir embriones *in vitro* a partir de un gameto femenino sin la contribución del gameto masculino (Yu et al., 1997). La partenogénesis representa una herramienta válida para evaluar la calidad de los ovocitos madurados *in vitro* y el desarrollo temprano de los embriones, también permite asistir los protocolos de inyección citoplasmática y para la activación del ovocito durante la clonación por transferencia nuclear (Gasparrini et al., 2004) o para evaluar la calidad de ovocitos criopreservados/descongelados (Dinnyés et al., 2000). La partenogénesis es un fenómeno reproductivo que ocurre en diferentes animales inferiores (insectos, lagartos, serpientes, peces y aves) en el que un ovocito inicia su desarrollo para generar descendencia sin la contribución paterna (Kharched y Birade, 2013). Aunque no es natural para los mamíferos, se ha informado que la partenogénesis ocurre espontáneamente, hasta cierto punto, en varias especies como bovinos (Lechniak et al., 1998), ratas (Zernicka-Goetz, 1991), ratones (Eppig et al., 2000; Fedorushchenko et al., 1996) y camélidos (Abdoon et al., 2007; Mesbah et al., 2004). La partenogénesis puede también ser inducida artificialmente en ovocitos de mamíferos mediante efectos físicos, químicos y estimulación eléctrica, procesos que imitan las oscilaciones de calcio intracelular inducidas por los espermatozoides durante la fecundación natural desencadenando la reanudación y finalización de la meiosis. Para la producción de embriones partenogenéticos se han activado con éxito ovocitos de diferentes especies: en vacas (Dinnyés et al., 2000; Li et al., 2002; Men et al., 2002), búfalos (Gasparrini et al., 2004; Saikhun et al., 2004), cabras (Ongeri et al., 2001; Begin et al., 2003), ratas (Krivokharchenko et al., 2003), porcinos (Iwamoto et al., 2005) y en camélidos sudamericanos domésticos (Ruiz et al., 2007, 2015).

La activación es un proceso que se inicia normalmente en el ovocito al momento que es penetrado por el espermatozoide durante la fecundación (Alberio y Zakhartchenko 2001) elevándose en forma breve y periódica los niveles del calcio intracelular (Tanaka 1997). En la mayoría de los mamíferos, el ovocito recién liberado del folículo se encuentra detenido en Metafase II debido a los altos niveles citoplasmáticos del factor promotor de la maduración (FPM). Una vez que se han fusionado el espermatozoide y el ovocito inicia con la liberación de calcio intracelular, provocando la inactivación del FPM y el consecuente reinicio y término de la meiosis hasta la extrusión del segundo corpúsculo polar (CP) y la formación de los pronúcleos (Williams 2002).

Métodos de activación de ovocitos

En la activación partenogenética, el ovocito requiere la ocurrencia de las oscilaciones de calcio para inactivar el FPM, reanudar el proceso de la meiosis con la consecuente extrusión del segundo corpúsculo polar y la formación de los pronúcleos. Estos procesos son provocados mediante el uso de diferentes agentes, utilizados como estímulos físicos o químicos (Paffoni et al., 2008), capaces de inducir el desarrollo embrionario *in vitro*.

Los procesos que tienen lugar en el interior de los ovocitos activados artificialmente parecen ser similares a los que ocurren tras la activación inducida por el espermatozoide. Sin embargo, en lugar de desencadenarse una serie de oscilaciones de Ca^{2+} , la mayoría de estos estímulos partenogenéticos inducen la formación de un solo pico de Ca^{2+} . Dependiendo del estímulo puede o no producirse la emisión del segundo CP. La exocitosis de gránulos corticales también ocurre en menor proporción y la membrana nuclear se reconstruye alrededor de unos pocos cromosomas (Bos-Mikich et al., 2016).

Dependiendo del agente activador usado, se pueden producir embriones partenogenéticos haploides o diploides, según se produzca la extrusión o no del segundo CP (Bos-Mikich et al., 2016).

En la actualidad contamos con una amplia gama de protocolos de activación; sin embargo, aún es necesario establecer protocolos específicos y más eficientes para las diferentes especies.

Para la inducción del aumento de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático, generalmente se utilizan productos químicos tales como cloruro de estroncio ($SrCl_2$) en el ratón, ionomicina/ionóforo de calcio en bovinos y ovinos, la estimulación eléctrica en porcinos (Kragh et al., 2005). Para la posterior inactivación del FPM, luego del estímulo inicial, se realiza tratamiento con otros agentes, tales como: cicloheximida (CHX), 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) o roscovitina (ROS), que reducen la actividad del FPM, actuando sobre la ciclina B y la fosforilación de las proteínas quinasas. Para mantener la ploidía, se usan inhibidores de actina, que evitan la polimerización de los filamentos de actina, por ende, impiden la extrusión del segundo CP. Entre estos agentes encontramos a la citocalasina B o D (CB, CD), y desde hace relativamente poco, la latrunculina A (LatA). (Himaki et al., 2010).

Uno de los agentes físicos en la activación de ovocitos es la activación eléctrica, el cual ha sido usada en diferentes especies como el ratón (Onodera y Tsunoda, 1989); conejo (Özil, 1990); y bovino (Collas et al., 1993). La activación mediante pulso eléctrico induce la formación de poros a nivel de la membrana plasmática, que facilita el paso de Ca^{2+} extracelular hacia el interior del ooplasma (Liu et al., 2015). Esto provoca la inactivación transitoria del FPM, a través de un solo pico de Ca^{2+} (Zhu et al., 2002; Hosseini et al., 2008; Hai et al., 2014). Para prevenir la reactivación del FPM es necesario usar un inhibidor de síntesis de proteínas o inhibidores más específicos de la fosforilación de proteínas kinasas. La inhibición de la síntesis de proteína conduce a una significativa disminución del FPM activo (Martinez et al., 2003).

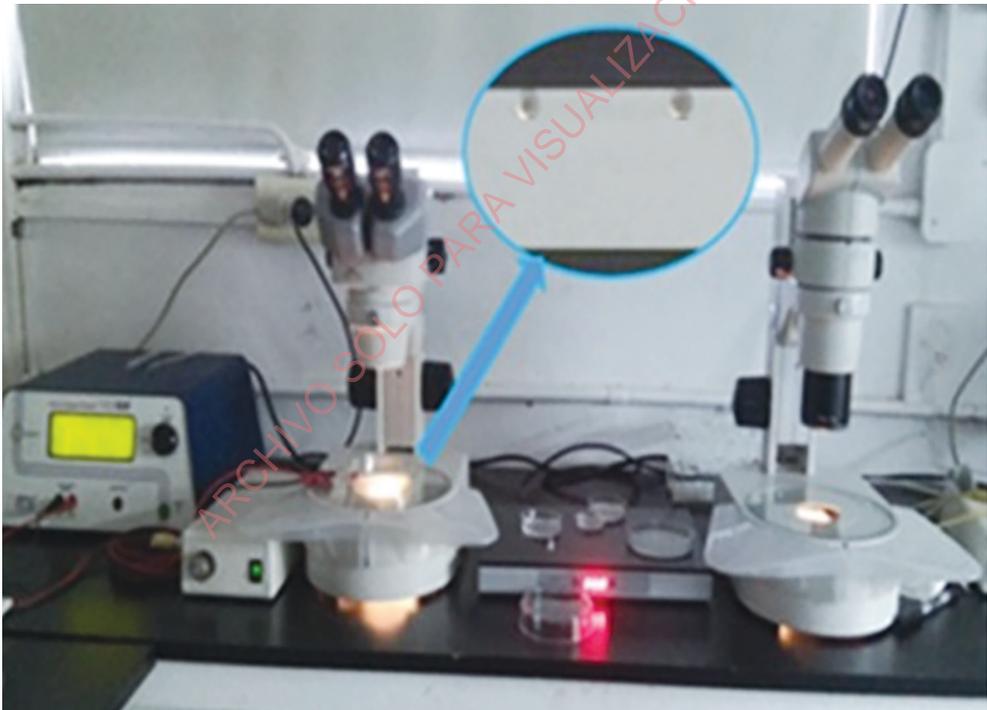


Figura 1. Activación eléctrica: El ovocito es colocado entre dos electrodos, el pulso eléctrico que genera el electroporador provoca el incremento de Ca^{+} para su activación y post formación de embriones partenogénéticos haploides o diploides. Esta técnica también puede ser usada para asistir a la clonación, ICSI y otras técnicas.

Para una eficiente activación de los ovocitos, es importante lograr el ingreso de una cantidad óptima de Ca^{2+} . Esta cantidad de Ca^{2+} es proporcional al número y tamaño de los poros inducidos por la estimulación eléctrica. El número de

impulsos, la intensidad de campo de pulso y la duración de los mismos, afectarán el influjo de Ca^{2+} al interior del ovocito, y tendrán un efecto en el desarrollo posterior del embrión (Zhu et al., 2002). Se observó una relación inversa entre la intensidad de campo eléctrico y el número de impulsos en los conejos, ratones y cerdos (Collas y Robl, 1990; Collas et al., 1989; Özil, 1990; Zhu et al., 2002). Con una baja intensidad de campo y un mínimo pulso, se inducen bajas afluencias de Ca^{2+} , que son insuficientes para la activación del ovocito. Por el contrario, múltiples pulsos con un alto campo de fuerza perjudican al desarrollo de los ovocitos al provocar la formación excesiva de poros y daños en la integridad de la membrana (Lee et al., 2004).

Posterior al impulso inicial tenemos diferentes agentes químicos durante la producción de embriones partenogenéticos los cuales, se describen a continuación:

La Cicloheximida (CHX), es producida por la bacteria *Streptomyces griseus*. Es un inhibidor de la síntesis de proteínas, de la ciclina B y de otras proteínas de vida corta. Baja la actividad del FPM y los cromosomas decondensan para formar un pronúcleo (Mori et al., 2008). Esta droga se utiliza durante 3 a 5 horas después de inducir la liberación de calcio. El uso de la CHX después de la inducción de los picos de Ca^{2+} , provoca una dinámica de inactivación del FPM similar a la inducida por el espermatozoide (Liu y Yan, 1999). Los intervalos del FPM y MAPK también son similares. Sin embargo, algunos estudios demostraron que el uso de la CHX provoca anomalías en la dinámica del desarrollo embrionario temprano, por la deficiencia en el transporte de proteínas citoplasmáticas (Soloy et al., 1997). Para la especie porcina, Ock et al., (2011) reportaron que el uso de la CHX puede inducir la formación de un PN irregular y un bajo desarrollo preimplantatorio. Por otra parte, los ovocitos tratados con CHX, sufren la extrusión del segundo CP, resultando en embriones haploides.

Por tal motivo, si se quiere obtener embriones partenogenéticos diploides es necesario además el tratamiento con otras drogas, como la CB o LatA (Kragh et al., 2005; Himaki et al., 2010).

El 6-Dimetilaminopurina (6-DMAP) actúa como inhibidor de la fosforilación de proteínas quinasas (Szöllosi et al., 1993). Indirectamente, evita la reactivación del FPM, inhibiendo la fosforilación de MAPK y bloqueando a la fosfatasa CDC25, que son los encargados de llevar a cabo la activación del FPM (Alberio et al.,

2001). El 6-DMAP además presenta una acción directa sobre CDK1 (uno de los componentes del FPM), provocando fosforilación en uno de sus sitios inhibidores (Liu y Yang, 1999). Al usar 6-DMAP, la actividad del FPM declina media hora después de haber inducido el pico de Ca^{2+} ; por el contrario, MAPK disminuye 3 - 4 horas post activación. El periodo de incubación en 6-DMAP es de 3 a 4 horas, y se realiza luego de inducir los picos de Ca^{2+} , logrando elevados porcentajes de activación y formación de pronúcleos. Esta droga fue ampliamente aplicada en diversas especies: ratón (Oliveira et al., 2015), conejo (Collas y Robl, 1990), ovino (Smith y Wilmut, 1989), bovino (Bevacqua, 2007) y porcinos (Buemo et al., 2016).

A diferencia de la CHX, el tratamiento con 6-DMAP genera embriones diploides, por lo cual no es necesario adicionar drogas para evitar la extrusión del segundo CP (Moses y Masui, 1995; Cha et al., 1997). A pesar de haber obtenido altas tasas de desarrollo embrionarios inducidas por 6-DMAP, esta sustancia química provoca anormalidades cromosómicas y síntesis prematura del ADN (De la fuente y King, 1998). También induce tempranamente la desfosforilación de MAPK provocando un desarrollo pro-nuclear más temprano (Liu y Yang., 1999).

Al usar inhibidores de filamentos de actina durante la maduración *in vitro* se puede bloquear el progreso de la meiosis (Kim et al., 1998). Algo similar ocurre en los embriones partenogénicos o producidos por transferencia nuclear de células somáticas cuando se trata con estos inhibidores al momento de la activación. Dado que no hay rotación del huso mitótico ni división celular, el ovocito forma un pronúcleo femenino adicional, al estar impedida la extrusión del segundo CP (Kim et al., 1998; Zhu et al., 2003). Entre los inhibidores de filamentos de actina encontramos la Citocalasina B (CB) y la Latrunculina A (LatA).

La Citocalasina B es una micotoxina que inhibe las divisiones citoplasmáticas y el movimiento celular, interviniendo a nivel de los filamentos de actina (Cooper, 1987). Provoca que los monómeros de actina libres no se adionen a los filamentos en el extremo positivo (Theodoropoulos et al., 1994), de este modo inhibe la extrusión del segundo CP y mantiene todos los cromosomas dentro del ooplasma. La CB adicionada durante la maduración bloquea la citocinesis e inhibe la liberación del primer CP (Verlhac et al., 2000). Algo similar ocurre durante la activación partenogénica diploide y la clonación, donde se bloquea la liberación del segundo CP o el pseudo-corpúsculo polar, según sea el caso.

La CB no afecta la separación de las cromátidas hermanas y permite la formación de dos pronúcleos (Cooper, 1987; Zhu, 2003), resultando en embriones partenogénicos diploides (Lénart et al., 2005).

Los resultados de Lee et al., (2004), muestran que más del 70% de ovocitos tratados con un solo pulso eléctrico (PE), seguido por incubación en CB presentan dos pronúcleos, siendo presumiblemente diploides en mayores tasas que los tratados solo con PE (40% de retención del segundo CP). Cha et al., (1997), también demostraron que el tratamiento con CB posterior a la estimulación partenogenética desencadena un mejor desarrollo de embriones porcinos.

La Latrunculina A (LatA) es una toxina purificada a partir de la esponja del Mar Rojo *Latrunculia magnífica*, que inhibe la polimerización de la actina. La LatA influye en la polimerización de actina formando un complejo molar 1:1 entre LatA y G-actina (Coué et al., 1987). Se une específicamente al monómero de actina (G-actina) y no tiene actividad para bloquear el extremo positivo de la F-actina (Yarmola et al., 2000).

La mayoría de los trabajos actualmente disponibles que describen el uso de LatA, han sido realizados en ratones. Mallol et al., (2015) reportaron un aumento significativo en la tasa de blastocistos producidos por transferencia nuclear. Además, Terashita et al., (2012; 2013), compararon la CB con LatA, como resultados encontraron que los ovocitos tratados con LatA mantuvieron todos los cromosomas dentro del ooplasma sin efectos adversos para la F-actina, similar a lo que sucede en la fecundación. Además, reportaron un incremento en la tasa de nacimientos de ratones clonados. Por el contrario, la localización de la F-actina en embriones clonados tratados con CB mostró ser diferente respecto a la de embriones fecundados.

Uso de la activación química en camélidos sudamericanos (CS)

En camélidos sudamericanos existen reportes sobre el uso de la activación química en la producción de embriones partenogenéticos, embriones producidos por transferencia nuclear o embriones producidos por ICSI. En llamas, se ha utilizado la Ionomicina de calcio (Sansinena et al 2003, 2007; Conde et al 2008) como fuente para elevar la concentración de calcio intracelular, combinado con el cicloheximide (Sansinena et al 2003) o 6-DMAP (Conde et al 2008; Sansinena et al 2007) como fuentes para inactivar el Factor Promotor de la Maduración (FPM) y reiniciar la meiosis. Existen diferencias en la concentración y el tiempo utilizados para la exposición de los ovocitos a la ionomicina de calcio en los autores citados. Sansinena et al., (2003) expusieron los ovocitos enucleados e inyectados con fibroblastos de llama (transferencia nuclear) por 5 minutos en Ionomicina de

Ca 5 mM a diferencia de Conde et al., (2008) que expusieron ovocitos inyectados con espermatozoides (ICSI) por 10 minutos en 0.5 μ M de Ionomicina de Ca. Los embriones producidos por Conde et al., (2008) desarrollaron hasta el estadio de blastocisto en cambio los embriones producidos por Sansinena et al., (2003) sólo uno llegó hasta mórula y 10 hasta el estadio de 8-16 células. Por otro lado, Sansinena et al., (2007) expusieron embriones producidos por ICSI durante 5 minutos en 7 μ M de Ionomicina de calcio y obtuvieron 63% de segmentación y 38% de embriones de 4-8 células. Los resultados pueden explicarse por las diferentes técnicas de micromanipulación utilizadas para la producción de embriones ICSI y transferencia nuclear o a las sustancias químicas utilizadas para la activación en diferentes concentraciones o en diferentes tiempos de exposición.

En el laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica (Ruiz et al 2007), se utilizó por primera vez en el Perú y en el Mundo la activación química de ovocitos para la producción de embriones partenogenéticos de alpaca y llama. Los ovocitos de alpaca y llama fueron expuestos por 5 minutos a 5 μ M de Ionomicina de Ca y después cultivados en SOF-IVC (fluido de oviducto sintético para cultivo *in vitro*) adicionado de 2 mM de 6-DMAP y 12,5 μ M de Citocalasina B por 3 horas. Concluidos estos tratamientos para la activación artificial, los ovocitos fueron cultivados por 8 días en SOF-IVC en una cámara modular (Billups Rotemberg) de cultivo a 38.5 °C con atmósfera húmeda de 5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂ al aire. Con este tratamiento se activaron químicamente 204 ovocitos de alpaca y 89 ovocitos de llama madurados *in vitro* por 25-26 horas. Las tasas de segmentación (embriones de dos células) a las 48 horas del tratamiento de activación fueron 63.7 y 50.6 para alpaca y llama respectivamente sin diferencias estadísticas significativas entre especies. Las tasas de blastocistos a los 8 días del tratamiento de activación fueron 7.7 y 4.4 para alpacas y llamas respectivamente sin diferencias estadísticas significativas entre especies.

Activación química de ovocitos de alpaca

Sacha et al., (2009) activaron químicamente ovocitos de alpaca con el objetivo de determinar la influencia de la categoría del ovocito en la producción *in vitro* de embriones partenogenéticos de alpaca. El trabajo de investigación se llevó a cabo

en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica ubicado en el Distrito, Provincia, Región de Huancavelica en Perú a 3680 msnm. Ovocitos de alpaca recuperados de ovarios obtenidos en el camal fueron seleccionados de acuerdo a su calidad en 4 categorías (I, II, III y IV). Los ovocitos de alpaca fueron madurados *in vitro* durante 22-24 horas. Posteriormente las 4 categorías fueron activadas químicamente para la producción *in vitro* de embriones partenogénéticos exponiéndolos durante 4 minutos a 5 μM de ionomicina de Ca a temperatura ambiente y posteriormente se incubó por 3 horas en 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) y 12,5 μM de Citocalasina en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 y 38.5 °C. Finalmente, los ovocitos fueron cultivados por 8 días en una incubadora con 5% CO_2 en gotas con 40 μl de SOF-IVC suplementado con 3 mg/ml de Albúmina. Las tasas de segmentación obtenidas fueron: 37.45%, 30.74%, 22.93% y 0.00% para las categorías I, II, III y IV respectivamente. Las tasas de mórulas para las 4 categorías fueron similares a las tasas de segmentación. Las categorías I, II y III fueron superiores estadísticamente a la categoría IV. En conclusión las categorías I, II y III son aptas para utilizarlas en la producción *in vitro* de embriones de alpaca.

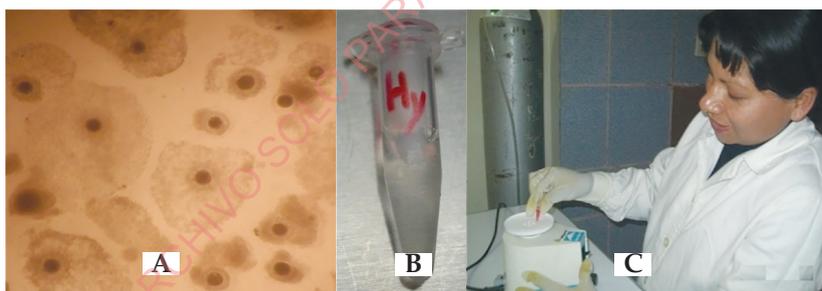


Figura 2. A) Ovocitos maduros de alpaca. B) Solución de Hialuronidasa. C) Agitación en vortex de ovocitos maduros de alpaca en solución de Hialuronidasa.

Taipe et al., (2010) realizaron un estudio con el objetivo de determinar la concentración óptima del etanol para la activación química de ovocitos de alpaca. Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica. Se aspiraron ovocitos de alpaca de ovarios recuperados en el Camal Municipal de Huancavelica. Las células del cúmulo que rodean a los ovocitos fueron separadas agitando los ovocitos durante dos minutos en una solución de hialuronidasa al 0.1% después de 22-24 horas de maduración *in vitro*. Posteriormente los ovocitos fueron divididos en 4 grupos y expuestos por 4 minutos en 5% (T1), 7% (T2), 9%(T3) de etanol o en 5 μM de

ionomicina de Ca (grupo control) a temperatura ambiente y posteriormente los 4 grupos se incubaron por 3 horas en 2mM de 6 dimetilaminopurina (6-DMAP) y 12.5 μ M de Citocalasina B a 38.5 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Finalmente, los ovocitos fueron cultivados por 8 días en una incubadora con 5% de CO₂ en gotas con 40 ul de SOF-IVC suplementado con 3 mg/ml de albúmina. Las tasas de segmentación obtenidas fueron: 25.0%, 21.0%, 9.3% y 33.6% y las tasas de blastocistos fueron: 7.0%, 6.3%, 4.0% y 4.7% para 5%, 7%, 9% de etanol y 5 μ M de ionomicina de Ca respectivamente. En conclusión, utilizando 5% de etanol para la activación química de ovocitos de alpaca se obtuvo mejor desarrollo embrionario *in vitro*.

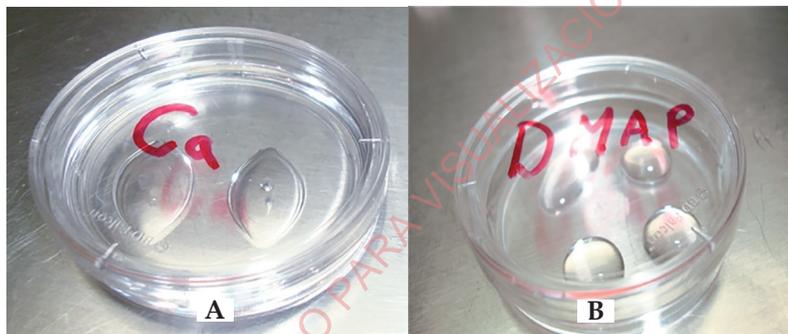


Figura 3. A) Placa Petri con gotas de 5 μ M de Ionomicina de Ca en SOF-HEPES. B) Placa Petri con gotas con solución de 2 mM de 6-DMAP y 12.5 μ M de Citocalasina B en SOF-IVC.

Taipe et al., (2011) realizaron un estudio con el objetivo de evaluar diferentes tiempos de exposición en etanol de ovocitos de alpaca para su activación e inducir desarrollo embrionario. Complejos ovocitos-cúmulo (COCs) de alpaca fueron aspirados de ovarios recuperados en el camal municipal de Huancavelica. Las células del cúmulo fueron separadas agitando los COCs durante 2 minutos en una solución de hialuronidasa al 0.1% después de 22-24 horas de maduración *in vitro*. Posteriormente los ovocitos fueron expuestos por 3(T1), 4(T2) o 5(T3) minutos a una solución con 5% de etanol seguido de una exposición por 3 horas en 2mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) y 12.5 μ M de Citocalasina B y un grupo control de ovocitos se expuso a 5 μ M de ionomicina de Ca (4 minutos) + 2mM de 6-DMAP y 12.5 μ M de Citocalasina B (3 horas). Luego los ovocitos fueron cultivados en gotas de 40 ul de mSO-IVC suplementado con 3 mg/ml de albúmina por 8 días a 39.0 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Las tasas de segmentación obtenidas fueron: 40.0%, 45.4%, 47.5% y 36.0%; mórula: 25.6%, 25.9%, 23.8% y 21.6%; y blastocistos: 12.2%, 7.4%, 7.9% y 5.0% para T1, T2, T3 y

grupo de control respectivamente. Con la exposición por 3 a 5 minutos en etanol se obtienen los mismos resultados de desarrollo embrionario que utilizando Ionomicina de Ca. El etanol puede utilizarse alternativamente al calcio para la activación química de ovocitos de alpaca.

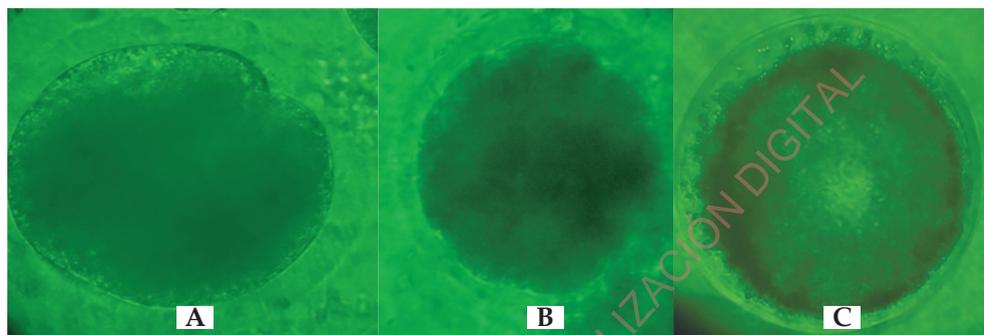


Figura 4. A) Embrión partenogenético de alpaca de dos células. B) Mórula partenogenética de alpaca. C) Blastocisto partenogenético de alpaca.

Vargas et. al., (2012) evaluaron el efecto del tiempo de exposición en Ionomicina de Ca y en 6-DMAP para optimizar un protocolo de activación química de ovocitos de alpaca. El estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica, ubicado a 3680 msnm. Ovarios de alpacas beneficiadas en el Camal de Huancavelica fueron utilizados para la aspiración folicular con una jeringa de 5 ml y aguja 21g. Los complejos ovocito-cúmulo (COCs) recuperados fueron madurados *in vitro* en TCM-199 suplementado con HEPES 25 mM, Piruvato de Na 0.2 mM, Sulfato de gentamicina 50 µg/ml, FSH 0.02 unidades/ml, Estradiol 17-β 1 µg/ml y Suero Fetal Bovino al 10% e incubados a 38.5°C en una atmósfera con 5% CO₂ por espacio 22-24 horas. Luego, para eliminar las células del cúmulo que rodean al ovocito, los COCs fueron expuestos a SOF-HEPES con hialuronidasa al 0.1%. Los ovocitos fueron cultivados por 2, 3, 4 y 5 minutos en Ionomicina en un primer experimento y por 1, 2, 3 y 4 horas en 6-DMAP y 12,5 µM de Citocalasina en un segundo experimento, a 38.5°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Finalmente, los ovocitos fueron cultivados por 8 días en una incubadora con 5% de CO₂ en gotas que contenían 40 uL de SOF-IVC con 3 mg/ml de albúmina. Los datos de desarrollo embrionario fueron registrados a los 2 y 8 días. Los resultados en el experimento 1 fueron: 30.4%, 45.7%, 39.3% y 27.0% de segmentación y 2.8%, 7.9%, 5.7% y 1.9% de blastocistos para 2, 3, 4 y 5 minutos de exposición en ionomicina respectivamente, siendo mejor estadísticamente 3 minutos de

exposición en ionomicina. Los resultados en el experimento 2 fueron: 29.4%, 38.7%, 47.0% y 39.8% de segmentación y 2.8%, 3.7%, 9.1% y 5.7% de blastocistos para 1, 2, 3 y 4 horas de exposición en 6-DMAP respectivamente, siendo mejor estadísticamente 3 horas de exposición en 6-DMAP. En conclusión, la exposición por 3 minutos en Ionomicina de Calcio y por 3 horas en 6-DMAP son los tiempos óptimos para la activación química de ovocitos de alpaca.

Activación química para evaluar ovocitos criopreservados/descongelados

Ruiz et al., (2009a) activaron químicamente ovocitos de alpaca posterior a la vitrificación/descongelación. Ovocitos de alpaca recuperados de ovarios obtenidos en el camal, fueron madurados *in vitro* por 25 horas en una cámara modular con 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂ al aire en medio TCM-199 suplementado con Piruvato de Na, HEPES, Sulfato de Gentamicina, FSH, Estradiol 17-β y suero fetal bovino. Después de la maduración, los ovocitos fueron separados de las células de la granulosa con hialuronidasa al 0.1%, y se dividieron en 3 tratamientos, TI: Ovocitos vitrificados. TII: Ovocitos expuestos a las soluciones de vitrificación. TIII: Ovocitos no vitrificados ni expuestos (frescos). Los ovocitos fueron vitrificados utilizando una solución de equilibrio con 4% de etilenglicol y una solución de vitrificación con 35% de etilenglicol, 5% de polivinilpirrolidona y 4M de Trehalosa. Posteriormente los 3 grupos de ovocitos fueron cultivados en SOF-HEPES conteniendo 5 μM de ionomicina por 4 minutos e inmediatamente después cultivados en gotas de 80 μl de SOF-IVC suplementado con 3 mg/ml de BSA, 2 mM de 6-DMAP y 12,5 μM de Citocalasina B por 3 horas en incubadora con 5% CO₂. Posteriormente los ovocitos fueron cultivados por 8 días en incubadora con 5% CO₂ en gotas con 40 μl SOF-IVC suplementado con 3 mg/ml de BSA. Se encontró 41.6%, 31.3 y 2.7% de ovocitos dañados luego de la vitrificación o de la exposición a la solución vitrificante. Las tasas de segmentación fueron: 39.9%, 49.5% y 62.4% para TI, TII y TIII respectivamente. Las tasas de blastocistos fueron: 0.0%, 0.0% y 9.2% para TI, TII y TIII respectivamente.

Ruiz et al., (2009b) evaluaron el efecto de la exposición a etilenglicol de ovocitos maduros de alpaca sobre el desarrollo de embriones partenogénicos de alpaca. Ovocitos de alpaca recuperados de ovarios obtenidos en el camal, fueron madurados *in vitro* por 25 horas en incubadora con 5% CO₂ en medio TCM-199 suplementado con Piruvato de Na, HEPES, Sulfato de Gentamicina, FSH, Estradiol 17-β y suero fetal bovino. Después de la maduración, los ovocitos

fueron separados de las células de la granulosa con hialuronidasa al 0.1%. Los ovocitos que alcanzaron la metafase II fueron suspendidos en soluciones con 0%, 2%, 4%, 6% y 8% de etilenglicol en solución base compuesta por TCM-199 suplementado con 20% de suero fetal bovino y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina. Posteriormente los ovocitos fueron cultivados en SOF-HEPES conteniendo 5 µM de ionomicina por 4 minutos e inmediatamente después cultivados en gotas de 80 µl de SOF-IVC suplementado con 3 mg/ml de BSA, 2 mM de 6-DMAP y 12,5 µM de Citocalasina B por 3 horas en incubadora con 5% CO₂. Posteriormente los ovocitos fueron cultivados por 8 días en incubadora con 5% CO₂ en gotas con 40 µl SOF-IVC suplementado con 3 mg/ml de BSA. Se encontró 3.2%, 11.9%, 16.0%, 22.2% y 22.8% ovocitos degenerados luego de la exposición a 0%, 2%, 4%, 6% y 8% de etilenglicol respectivamente. Se encontró 56.5%, 48.9%, 46.0%, 45.5% y 43.2% de segmentación (embriones de dos células) con 0%, 2%, 4%, 6% y 8% de etilenglicol respectivamente. Se encontró 5.8%, 5.2%, 5.4%, 5.7% y 5.2% de blastocistos con 0%, 2%, 4%, 6% y 8% de etilenglicol respectivamente.

Fernández y Esteban (2010), evaluaron el efecto de diferentes niveles de etilenglicol y glicerol en el desarrollo de embriones partenogenéticos de alpacas. Se recuperaron 560 ovocitos de 140 ovarios de alpacas que fueron beneficiadas en el camal municipal de Huancavelica; los ovocitos fueron separados de las células del cúmulo agitándolos durante 2 minutos en una solución de hialuronidasa al 0.1%, después de 22-24 horas de maduración *in vitro* fueron expuestos a 0%, 4%, 6% y 8% de etilenglicol y glicerol respectivamente por 5 minutos, posteriormente fueron expuestos durante 4 minutos en 5 µM de ionomicina de Ca, luego se incubó por 3 horas en 2 mM de 6-DMAP y 12.5 µM de Citocalasina B a 38.5 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂; finalmente los ovocitos fueron cultivados por 8 días (en incubadora con 5% CO₂) en gotas con 40 µl de SOF-IVC suplementado con 3 mg/ml de albúmina. Las tasas de segmentación obtenidas fueron: 31.39%, 24.78%, 22.68% y 20.24%, en promedio de segmentación para 0%, 4%, 6% y 8% de etilenglicol. Las tasas de mórulas obtenidas fueron: 18.71%, 12.08%, 9.60% y 8.45% en promedio para 0%, 4%, 6% y 8% de etilenglicol, mientras en la exposición a glicerol no se obtuvo segmentación ni mórulas para ambos casos.

Ruiz et al., (2011) realizaron un estudio con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración de etilenglicol sobre la viabilidad morfológica y fisiológica de ovocitos vitrificados/descongelados de alpaca. Los ovocitos de alpaca fueron madurados *in vitro* por 24-25 horas en estufa con 5% CO₂. Posteriormente fueron vitrificados en microgotas sobre un papel de aluminio flotando en nitrógeno

líquido. Previamente los ovocitos fueron expuestos 12 minutos en una solución con 4% de etilenglicol (EG) y luego en soluciones con 25% (T1), 35% (T2) o 45% (T3) de EG por 30 segundos. Las microgotas vitrificadas se almacenaron en nitrógeno líquido y fueron descongeladas 1-4 días después. También se expusieron ovocitos a 25% (TIV), 35% (TV) o 45% (TVI) de EG por 30 segundos, los cuales no fueron vitrificados (controles de toxicidad). Todos estos ovocitos y un grupo control (TVII) fueron activados químicamente exponiéndolos a 5 μM de ionomicina de Ca por 4 minutos y luego cultivados 3 horas en 2 mM de 6-DMAP y 12.5 μM de Citocalasina B a 38.5 °C en una estufa con 5% CO_2 . Los posibles embriones se cultivaron por 8 días en medio SOF-IVC. Las tasas de sobrevivencia fueron 59.5%, 54.0%, 38.3%, 70.2%, 66.5%, 60.6% y 94.8%; las tasas de segmentación fueron: 27.6%, 34.7%, 11.7%, 49.1%, 47.3%, 38.7%, 51.1%; las tasas de blastocistos fueron: 0.0%, 2.9%, 0.0%, 8.3%, 10.5%, 4.2% y 17.1% para TI, TII, TIII, TIV, TV, TVI y TVII respectivamente. En conclusión se demostró que ovocitos de alpaca vitrificados/descongelados son morfológicamente y fisiológicamente viables, y que con 35% de etilenglicol se obtienen mejores tasas de desarrollo embrionario.

Activación química de embriones producidos por ICSI

Conde et al (2006, 2007), compararon el desarrollo de embriones producidos por ICSI con y sin activación química. Los embriones fueron activados con Ionomicina de Ca 0.5 μM por 10 minutos y 6-DMAP 2 mM por 3 horas. El semen fue colectado por electroeyaculación y fue incubado en 25% (v/v) en una solución de colagenasa a 37 °C para reducir su viscosidad. Las tasas de división fueron 36.0% y 7.4% con y sin activación química; y las tasas de blastocistos fueron 44.4% y 50.0% (blastocistos/divididos) y 16.0% y 3.7% (blastocistos/ovocitos) con y sin activación química. Indican que a pesar de haber alcanzado una alta tasa de blastocistos con ICSI sin activación química y sin diferencias estadísticas con el tratamiento de activación química sugieren utilizar una mayor cantidad de ovocitos para determinar si realmente no hay diferencias estadísticas con y sin activación química debido al poco número de ovocitos que no recibieron estimulación química.

Sansinema et al (2007) evaluaron diferentes tratamientos de activación de embriones producidos por ICSI: A) sin activación, B) activados solo con ionomicina y C) activados con Ionomicina y 6-DMAP. Los espermatozoides

fueron recuperados de la vagina de llamas hembras colocando un espejito y aspirando el eyaculado con un catéter plástico conectado a una jeringa de 20 ml después de permitir la cópula de un macho de fertilidad comprobada. 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 llamas requieren de un tratamiento de activación química.

CONCLUSIONES

Es posible el uso de la activación química para producir embriones partenogenéticos de alpacas y llamas y para producir embriones por ICSI en llamas. Es necesario mayores estudios para obtener un protocolo para activar embriones producidos por transferencia nuclear en camélidos sudamericanos. El protocolo óptimo para activar embriones partenogenéticos de alpacas es 0.5 μM de ionomicina de Ca por 3 minutos de exposición y luego 3 horas de exposición en 2 mM de 6-DMAP y 12.5 μM de Citocalasina B. Se puede usar el etanol al 5% por 3-5 minutos alternativamente para activar ovocitos de alpacas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdoon ASS, Kandil OM, Berisha B, Kliem H, Schams D., 2007. Morphology of dromedary camel oocytes and their ability to spontaneous and chemical parthenogenetic activation. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 88–93.
- Alberio R, Zakhartchenko V. 2001. Clonación de animales de interés zootécnico. En: Palma G (ed). *Biotecnología de la Reproducción*. INTA, Buenos Aires, Pp. 353-382.
- Alberio R, Zakhartchenko V, Motlik J, Wolf E. 2001. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer, *Int. J. Dev. Biol.* 45(7):797-809.
- Begin I, Bathia B, Baldassarre H, Dinnyes A, Keefer K. 2003. Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2-to -4 cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology* 59: 1839-1850.

- Bevacqua R. 2007. Embriones de bovino diploides por parthenogenesis. Universidad Nacional de Quilmes. Tesis.
- Bos-Mikich A, Bressan FF, Ruggeri RR, Watanabe Y, Meirelles FV. 2016. Parthenogenesis and Human Assisted Reproduction. *Stem Cells Int.* 2016:1970843.
- Buemo C, Gambini A, Moro LN, Hiriart MI, Fernández-Martín R, Collas P, Salamone DF. 2016. Embryo Aggregation in Pig Improves Cloning Efficiency and Embryo Quality. *Plos One.* 19:11(2).
- Cha SK, Kim NH, Lee SM, Baik CS, Lee HT, Chung KS. 1997. Effect of cytochalasin B and cycloheximide on the activation rate, chromosome constituent and in vitro development of porcine oocytes following parthenogenetic stimulation. *Reprod Fertil Dev.* 9(4):441-6.
- Collas P, Robl JM. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol Reprod.* 43(5):877-84.
- Collas P, Balise JJ, Hofmann GA, Robl JM. 1989. Electrical activation of mouse oocytes. *Theriogenology.* 32(5):835-44.
- Collas P, Robl JM. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol Reprod.* 43(5):877-84.
- Collas P, Balise JJ, Hofmann GA, Robl JM. 1989. Electrical activation of mouse oocytes. *Theriogenology.* 32(5):835-44.
- Collas P, Fissore R, Robl JM, Sullivan EJ, Barnes FL. 1993. Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 34:212–223.
- Conde PA, Herrera C, Trasorras VL, Giuliano S, director A, Miragaya MH, Chaves MG, Carchi MI, 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, 1-4. Cooper JA. 1987. Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. *J Cell Biol.* 105(4):1473-8.
- Coué M, Brenner SL, Spector I, Korn ED. 1987. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett.* 213(2):316-8.
- De La Fuente R, King WA. 1998. Developmental consequences of karyokinesis without cytokinesis during the first mitotic cell cycle of bovine parthenotes. *Biol Reprod.* 58(4):952-62.
- Dinnyés A, Dai Y, Jiang S, Yang X. 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization,

- and somatic cell nuclear transfer. 2000. *Biology of Reproduction*. 63, 513-518.
- Eppig JJ, Wigglesworth K., Hirao Y. 2000. Metaphase I arrest and spontaneous parthenogenetic activation of strain LTXBO oocytes: chimeric reaggregated ovaries establish primary lesions in oocytes. *Dev. Biol.* 224, 60–68.
- Fedorushchenko AN, Koval TIU, Khamidov DKH., 1996. The effect of a nerve growth factor from different biological sources on the spontaneous maturation of mouse oocytes and on the parthenogenetic activation of pronucleus formation. *Tsitologiya* 38, 1211–1216.
- Fernández y Esteban. 2010. Efecto de diferentes niveles de glicerol y etilenglicol en el desarrollo de embriones partenogenéticos de alpacas. Tesis Ing. Zootecnista. Universidad Nacional de Huancavelica.
- Gasparrini B, Boccia L, De Rosa A, Di Palo R, Campanile G, Zicarelli L. 2004. Chemical activation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by different methods: effects of aging on post-parthenogenetic development. *Theriogenology* 62: 1627 – 1637.
- Guo-Cheng L, Dong H, Yan-Guang W, Zheng-Bin H, Suo-Feng M, Xin-Yong L, Chong-Le C, Jing-He T. 2005. Effects of duration, concentration, and timing of ionomycin and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) treatment on activation of goat oocytes. *Mol Reprod Dev* 71, 380-388.
- Hai T, Teng F, Guo R, Li W, Zhou Q. 2014. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res*. 24(3):372-5.
- Himaki T, Mori H, Mizobe Y, Miyoshi K, Masahiro S, Takao S, Yoshida M. 2010. Latrunculin A Dramatically Improves the Developmental Capacity of Nuclear Transfer Embryos Derived from Gene-Modified Clawn Miniature Pig Cells *Cell Reprogram*. 12(2):127-31.
- Hosseini S, Hajian M, Moulavi F, Shahverdi A, Nasr-Esfahani M. 2008. Optimized combined electrical–chemical parthenogenetic activation for in vitro matured bovine oocytes. *Anim Reprod Sci*. 108:122–133.
- Iwamoto M, Onishi A, Fuchimoto D, Somfai T, Takeda K, Tagami A, Hanada H, Noguchi J, Kaneko H, Nagai T, Kikuchi K. 2005. Low oxygen tension during in vitro maturation of porcine follicular oocytes improves parthenogenetic activation and subsequent development to the blastocyst stage.
- Kharched SD, Birade HS. 2013. Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for in vitro embryo production. A review. *Adv. Bios. Biotechnol.* 4, 170–182.

- Kim NH, Chung HM, Cha KY. 1998. Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. *Human Reprod.* 13:2217-2222.
- Kragh PM, Vajta G, Corydon TJ, Purup S, Bolund L, Callesen H. 2004. Production of transgenic porcine blastocysts by hand-made cloning. *Reprod Fertil Dev.* 16:315- 318.
- Krivokharchenko A, Popova E, Zaitseva L, Vil'ianovich L, Ganten D, Bader M. 2003. Development of parthenogenetic rat embryos. *Biology of Reproduction* 68: 829-836.
- Lechniak D, Cieslak D, Sosnowski J, 1998. Cytogenetic analysis of bovine parthenotes after spontaneous activation in vitro. *Theriogenology* 49, 779-785.
- Lee JW, Tian XC, Yang X. 2004. Optimization of parthenogenetic activation protocol in porcine. *Mol Reprod Dev.* 68(1):51-57.
- Lènard P, Bacher CP, Daigle N, Hand AR, Ellenberg J. 2005. A contractile nuclear actin network drives chromosome congression in oocytes. *Nature.* 436:812-818.
- Li X, Su L, Li Y, Ji W, Dinnyés A. 2002. Vitrification of Yunnan Yellow Cattle oocytes: work in progress. *Theriogenology* 58: 1253 – 1260.
- Liu L, Yang X. 1999. Interplay of Maturation- Promoting Factor and Mitogen-Activated Protein Kinase Inactivation during Metaphase- to- Interphase Transition of Activated Bovine Oocytes. *Biology of Reprod.* 61:1-7.
- Liu S, Cui K, Li HL, Sun JM, Lu XR, Shen KY, Liu QY, Shi de S. 2015. Comparison of chemical, electrical, and combined activation methods for in vitro matured porcine oocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 51(2):103-12.
- Martinez Diaz, MA, Suzuki M, Kagawa M, Ikeda K, Takahashi Y. 2003. Effects of cycloheximide treatment on in-vitro development of porcine parthenotes and somatic cell nuclear transfer embryos. *Jpn J Vet Res.* 50(4):147-55.
- Men H, Monson R, Rutledge J. 2002. Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. *Theriogenology* 57: 1095 - 1103.
- MesbahSF, Kafi M, Nili H, Nasr-Esfahani MH. 2004. Spontaneous parthenogenesis and development of camel (*Camelus dromedarius*) oocytes. *Vet. Rec.* 155, 498-500.
- Mori H, Mizobe Y, Inoue S, Uenohara A, Takeda M, Yoshida M, Miyoshi K. 2008.

- Effects of cycloheximide on parthenogenetic development of pig oocytes activated by ultrasound treatment. *J Reprod Dev.* 54(5):364-9.
- Moses RM, Masui Y. (1995). Metaphase arrest in newly matured or microtubule depleted mouse eggs after calcium stimulation. *Zigote*, 3(1) :1-8.
- Ock SA, Kwack DO, Mohana KB, Han J, Kim SW, Rho GJ. 2011. Effects of Activation Methods on DNA Synthesis and Development of Parthenogenetic Porcine Embryos. *Reprod Dom Anim.* 46:1082–1089.
- Oliveira RJ, Mantovani MS, Pesarini JR, Mauro MO, da Silva AF, Souza TR, Ribeiro LR. 2015. 6-Dimethylaminopurine and cyclohexamide are mutagenic and alter reproductive performance and intrauterine development in vivo, *Genet. Mol. Res.* 14 (1): 834-849.
- Ongeri EM, Bormann CL, Butler RE, Melican D, Gavin WG, Echelard Y, Krisher RL, Behboodi E. 2001. Development of goat embryos after in vitro fertilization and parthenogenetic activation by different methods. *Theriogenology* 55: 1933 - 1945.
- Onodera M, Tsunoda Y. 1989. Parthenogenetic activation of mouse and rabbit eggs by electric stimulation in vitro. *Gamete Res.* 22:277–283.
- Özil JP. 1990. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development.* 109:117–127.
- Paffoni A, Brevini TAL, Gandolfi FRG. 2008. Parthenogenetic activation: Biology and applications in the ART laboratory. *Placenta.* 29:121-125.
- Ruiz J, Landeo L, Mendoza J, Correa J, Silva M, Ratto M. 2015. In vitro developmental competence of alpaca (*Vicugna pacos*) and llama (*Lama glama*) oocytes after parthenogenetic activation. *Small Ruminant Research* 133 (2015) 148–152.
- Ruiz J, Mendoza J, Landeo L, Ratto M, Correa J. 2011. Efecto de la concentración de etilenglicol sobre la viabilidad de ovocitos vitrificados de alpaca (*vicugna pacos*). Resúmenes de la XXXIV REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA ASOCIACIÓN PERUANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL. UNT, Trujillo.
- Ruiz J, Ayuque G, Landeo L, Correa JE. 2009a. Activación partenogenética de ovocitos vitrificados de alpaca. ALEPRYCS 2009. México.
- Ruiz J, Mendoza J, Ayuque A., Ayuque G, Landeo L, Artica M, Correa JE. 2009b. Efecto de la exposición de ovocitos de alpaca en etilenglicol sobre el desarrollo partenogenético in vitro. ALEPRYCS 2009. México.

- Ruiz J., Correa J, Ayuque G, Landeo L, Yaranga M, Zacarías P. 2007. Producción in vitro de embriones partenogenéticos de alpaca y llama. I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú.
- Sacha D, Rojas R, Mendoza J, Ayuque G, Yaranga M, Ruiz J. 2009. Influencia de la categoría del ovocito en la producción de embriones partenogenéticos de alpaca (*vicugna pacos*) en Huancavelica. VI Congreso ALEPRYCS. México.
- Saikhun J, Sritanaudomehai H, Pavasuthipaisit K, Kitiyanant Y. 2004. Telomerase activity in swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes and embryos derived from in vitro fertilization, somatic cell nuclear transfer and parthenogenetic activation. *Reprod Dom Anim* 39: 162-167.
- Sansinena M, Taylor 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.
- Sansinena M, Taylor S, Taylor P, Denniston R, Godke R.. 2003. Production of Nuclear Transfer Llama (*Lama glama*) Embryos From in vitro matured llama oocytes. *Cloning Stem cells* 5, 191-198.
- Smith LC, Wilmut I. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol Reprod.* 40(5):1027-35.
- Soloy E, Kanka J, Viuff D, Smith SD, Callesen H, Greve T. 1997. Time course of pronuclear deoxyribonucleic acid synthesis in parthenogenetically activated bovine oocytes. *Biology of Reproduction, Champaign.* 57(1):27-35.
- Szöllösi MS, Kubiak JZ, Debey P, de Pennart H, Szöllösi D, Maro B. 1993. Inhibition of protein kinases by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. *J Cell Sci.* 104 (3):861-72.
- Tanaka H, 1997. Rol de la activación del ovocito en la fecundación y el trasplante de núcleos. AGCI e Instituto de Reproducción Animal. Universidad Austral de Chile.
- Taipe E, Contreras J, Landeo L, Sánchez V, Ruiz J. 2011. Efecto de diferentes tiempos de exposición en etanol para la activación química de ovocitos de alpaca. VII Congreso ALEPRyCS 2011. Huancavelica, Perú.

- Taipe E, Contreras J, Landeo L, Sánchez V, Ruiz J. 2010. Efecto del etanol en la activación química de ovocitos de alpaca (*Vicugna pacos*). Resúmenes de la XXXIII REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA ASOCIACIÓN PERUANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL. UNT, Trujillo.
- Terashita, Y., Yamagata, K., Tokoro, M., Itoi, F., Wakayama, S., Li, C., Sato, E., Tanemura, K., Wakayama, T. 2013. Latrunculin A treatment prevents abnormal chromosome segregation for successful development of cloned embryos. *PLoS One*. 8(10):78380.
- Terashita, Y., Wakayama, S., Yamagata, K., Li, C., Sato, E. et al. 2012. Latrunculin can improve the birth rate of cloned mice and simplify the nuclear transfer protocol by gently inhibiting actin polymerization. *Biol Reprod*. 86(6):180.
- Theodoropoulos PA, Gravanis A, Tsapara A, Margioris AN, Papadogiorgaki E, Galanopoulos V, Stournaras C. 1994. Cytochalasin B may shorten actin filaments by a mechanism independent of barbed end capping. *Biochem. Pharmacol*. 47:1875-1881.
- Vargas C, Paredes V, Landeo L, Ruiz J. 2012. Efecto del tiempo de exposición en Ionomicina de calcio y 6-Dimetilaminopurina en la activación química de ovocitos de alpaca (*Vicugna Pacos*). VI Congreso Mundial de Camélidos. Arica – Chile. 21-23 de Noviembre del 2012.
- Verlhac MH, Lefebvre C, Guillaud P. 2000. Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Current Biology*. 19:1303-1306.
- Wang W, Macháty Z, Abeydeera L, Prather R, Day B. 1998. Parthenogenetic activation of pig oocytes with calcium ionophore and the block to sperm penetration after activation. *Biol Reprod* 58, 1357-1366.
- Williams C. 2002. Signaling mechanism of mammalian oocyte activation. *Human Reprod Update*. 8, 313-321.
- Zernicka-Goetz M. 1991. Spontaneous and induced activation of rat oocytes. *Mol. Reprod. Dev*. 28, 169-176.
- Zhu J, Telfer EE, Fletcher J, Springbett A, Dobrinsky JR, De Sousa PA, Wilmut I. 2002. Improvement of an electrical activation protocol for porcine oocytes. *Biol Reprod*. 66:635-641.
- Zhu ZY, Chen DY, Li JS. 2003. Rotation of meiotic spindle is controlled by microfilaments in mouse oocytes. *Biology of Reproduction*. 68:943-946.

CAPÍTULO XI

CONOCIENDO A LAS CÉLULAS MADRE ESPERMATOGONIALES DE ALPACA

Martha Valdivia Cuya

RESUMEN

En esta revisión se evalúan las estrategias de identificación de las células madre espermatozonales mediante marcadores moleculares y de moléculas de reconocimiento localizados en la superficie de las membranas de estas células mediante PCR o con evaluación a través de citometría de flujo laminar. Observándose marcadores que se conservan entre las especies, pero otros marcadores especie-específicos. Asimismo, existen otras estrategias como el cultivo de células *in vitro* o la conservación de células madre espermatozonales a bajas temperaturas, donde se observa la proliferación de las células madre espermatozonales o de la conservación de las células madre espermatozonales mediante criopreservación.

INTRODUCCIÓN

Las células madre son células que poseen una alta capacidad de autorrenovación durante largos periodos de tiempo y son capaces de iniciar la diferenciación celular, fueron observadas inicialmente en embriones preimplantacionales (Zeng X et al., 2004; Cauffman G et al., 2004; Ullmann U et al., 2006; Blum B & Benvenisty N 2007; Atlasi Y et al., 2008) y han sido caracterizadas mediante el uso de herramientas moleculares y de reconocimiento de moléculas de superficie celular, como es el caso del reconocimiento de epítopes de glicano (α -N acetilgalactosamina) en la superficie celular de células madre embrionarias en murinos por la acción de *Dolichus biflorus agglutinin* (Nash., 2007). La disminución de este glicano en la superficie celular es el primer indicio que la diferenciación celular se ha iniciado, proponiendo a DBA como una herramienta útil y valiosa para discriminar a las células pluripotentes de las que han iniciado la diferenciación celular temprana. En el testículo adulto las células troncales o también denominadas células madre espermato goniales (“*Spermatogonial stem cells*”) fueron identificadas inicialmente durante el estudio de la espermatogénesis humana (Clermont Y 1963, 1966a, 1966b; Clermont Y & Bustos E 1966) y de rata (Clermont 1966) y caracterizadas como células troncales presentes en las asociaciones celulares del ciclo del epitelio germinal.

Las células troncales están presentes en las células de cordón umbilical, así como en órganos diferenciados, siendo el testículo uno de ellos; en este órgano se les denomina células madre espermato goniales y poseen características semejantes a las células madre embrionarias en estado de blastocisto (Thomson JA et al., 1998). En el testículo, las células troncales o células madre son denominadas células madre adultas y están presentes en un microambiente o nicho al interior del túbulo seminífero cuya regulación mediante señales endocrinas, paracrinas y autocrinas hace que este tipo celular mantenga las características de ser las responsables de mantener la fertilidad masculina en el individuo adulto (Garbuzov, A., et al., 2018). Se ha descrito la presencia SSC en el testículo de varias especies de mamífero como en: en ratones (Wu X et al., 2009), cerdos (Ogawa H, et al., 2000; Zheng Y et al., 2013), perros (Lee KH et al., 2016), toros (Zhang Z et al., 2008), caballos (Dobrinski I, 2005), felinos domésticos (Vansandt LM et al., 2016), mono Rhesus (Oatley JM & Brinster RL 2008), en primates no humanos (Nagano M et al, 2001; Fayomi A & Orwig 2018) y en humanos (Sadri-Ardekani H et al., 2009; Dym M et al., 2009).

Las SSC están presentes en cantidad reducida en los túbulos seminíferos de animales adultos. Se estima que, solo el 0,03% de la población de células corresponde a SSC en relación al resto de tipos celulares, que se encuentran en citodiferenciación en el testículo del ratón adulto (Tagelenbosch RA & de Rooij DG (1993), Vansandt LM et al., 2016), siendo el balance entre las SSC en autorrenovación y las de diferenciación celular lo que garantiza la fertilidad masculina (Ryu B-Y et al., 2005). Las SSC pueden conservar y transmitir información genética a la siguiente generación por lo que identificarlas y conservarlas sería una valiosa herramienta para la conservación biotecnológica de la fertilidad humana, de una especie silvestre o de una especie de importancia comercial, como en el caso de las alpacas.

Las SSC pueden ser identificadas por marcadores moleculares como: PGP9.5, CD90, GFR α 1, DBA, VASA, NANOG, POU5F1, ITGA6, ZBTB16 (Zheng Y et al., 2014, Savvulidi, F et al., 2019) e integrina B1 y Alfa 6, Figura 1 (Shinohara et al., 1999; Krebsbach, P & Villa-Diaz L, 2017).

El gen de la proteína 9.5 (PGP9.5); también conocido como UCHL1 corresponde a una ubiquitina hidrolasa carboxilo-terminal L1, se expresa exclusivamente en células germinales pre-meióticas masculinas. Por otra parte; el gen timocito antígeno diferenciador del cluster de diferenciación 90 (CD90) también conocido como THY1 reconoce a las SSC convirtiéndose en un marcador óptimo para las espermatogonias de animales domésticos. GFR α 1 - receptor de la familia GDNF α 1 involucrado en el establecimiento del nicho de las SSC. VASA, también conocido como polipéptido 4 de caja muerta o DDX4, NANOG, factor de transcripción relacionado con la pluripotencia de las células madre, POU5F1 (también conocido como Oct3/4 o Dominio POU clase 5 que es un factor de transcripción relacionado con la pluripotencia de las células madre (Sá R et al., 2013). DAZL es una proteína localizada en el núcleo de la espermatogonia, ITGA6 - Subunidad de integración Alpha 6, proteína, marcador molecular SSC de mamífero y la sonda *Dolichus biflorus agglutinin* (DBA) la cual reconoce a los residuos altamente expresados de N acetilgalactosamina presentes en la superficie de las membranas en las SSC. Las SSC de bovino son reconocidas mediante inmunoquímica por PLZF (conocido también como ZBTB16), PGP9.5 (conocido también como UCHL1), CD90 (conocido también como THY1), GFR α 1, DBA, VASA (conocido también como DDX4). NANOG, POU5F1 (conocido también como Oct3/4). Dominio POU, ITGA6; las SSC de porcino son reconocidas mediante inmunoquímica por PLZF (conocido también como ZBTB16), PGP9.5

(conocido también como UCHL1), CD90 (conocido también como THY1), VASA (conocido también como DDX4); las SSC de carnero son reconocidas por PLZF (conocido también como ZBTB16), PGP9.5 (conocido también como UCHL1), CD90 (conocido también como THY1), DBA y VASA. Las SSC de equino son reconocidas mediante inmunocitoquímicamente por PLZF (ZBTB16), GFR α 1 y DAZL (Savvulidi, F et al., 2019).

Nuestros estudios han logrado la identificación de las SSC en alpacas adultas luego de realizar un cultivo diferencial *in vitro* de las células espermatogoniales aisladas provenientes de testículos de machos adultos. En estos cultivos se realizó mediante análisis de PCR la identificación de la presencia de SSC mediante la expresión de Integrina β 1 y PLZF (Valdivia et al., 2019a). Por otra parte, se ha logrado identificar a la Integrina β 1 como marcador molecular específico en la superficie de las SSC de ratón que al ser transferidas produjeron espermatogénesis completa, demostrando su función biológica como SSC (Shinohara T et al., 1999). Además, se ha demostrado que la integrina β 1 está relacionada con el reconocimiento del nicho "homing" de las SSC en el testículo (Kanatsu-Shinohara M et al., 2008).

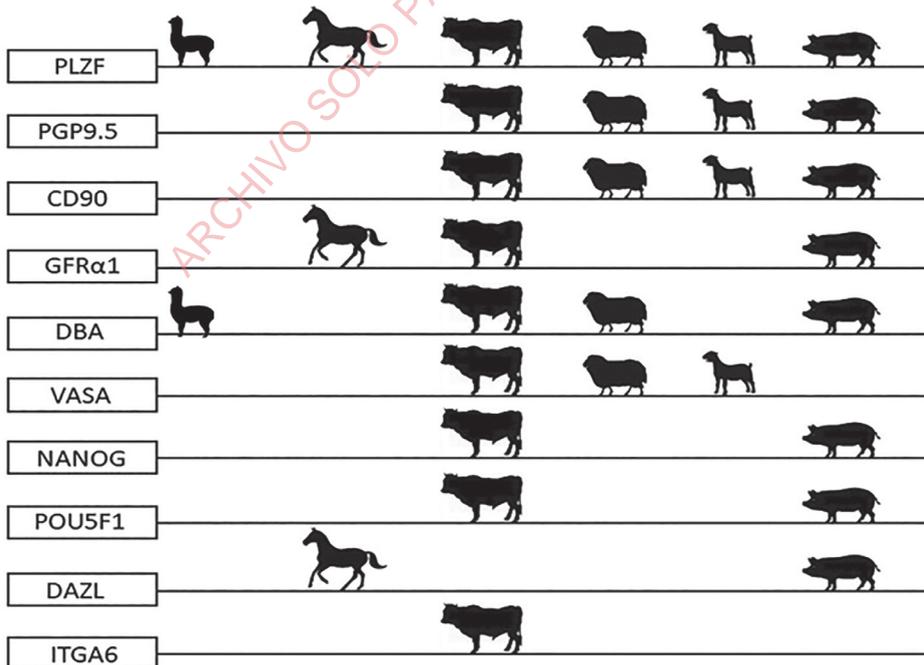
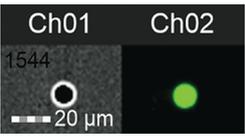
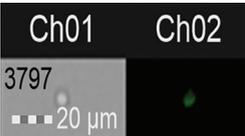
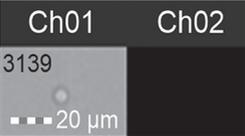


Figura 1. Marcadores moleculares de células madre espermatogoniales modificado de Savvulidi, F et al., 2019.

Por otro lado, los marcadores moleculares *Zbtb16* e integrina $\beta 1$ son marcadores de autorrenovación por lo que son importantes en la caracterización de las SSC de alpacas (Valdivia M et al., 2019a, Savvulidi, F et al., 2019). Asimismo, las SSC de alpaca se han identificado mediante el uso de *Dolichus biflorus agglutinin* (DBA) lectina que reconoce a los residuos de α -N- acetilgalactosamina (GalNAc) presentes en alta concentración en las SSC, disminuyen en las células que inician diferenciación y están ausentes en las células diferenciadas (Nash et al., 2007) en aislados de células espermato goniales de alpacas adultas mediante citometría de flujo. DBA por su capacidad de reconocer a los residuos de α -N- acetilgalactosamina (GalNAc) altamente reactivos en la superficie de las membranas plasmáticas de las SSC observadas en varias especies (Izadyar F et al., 2002, (Escada-Rebelo S et al., 2016; Nash R et al., 2007; Park Mh et al., 2018). Mediante el uso de este fluorocromo DBA conjugado a FITC hemos podido observar mediante citometría de flujo a tres poblaciones de células espermato goniales redondas que son reconocidas con distinta intensidad al fluorocromo de DBA-FITC y son descritas como sigue: fuertemente positivas “*strongly DBA positive*” (sDBA+), las células que han iniciado la citodiferenciación temprana se definen como débilmente positivas al DBA y se describen como *wDBA+* “*weakly positive DBA*” y las células redondas negativas a DBA- “*DBA negative*” que corresponden a células diferenciadas ya que pierden los residuos de α -N- acetilgalactosamina (GalNAc). Ver tabla N°1.

Tabla 1. Caracterización de las poblaciones de células redondas espermato goniales evaluadas mediante DBA-FITC (Valdivia et al., 2019)

Observación al citómetro	Caracterizada como:	Corresponde a:
	<i>Strongly DBA+(sDBA)</i>	Célula madre espermato gonial
	<i>Weakly positive DBA (wDBA+)</i>	Célula redonda espermato gonial en diferenciación temprana
	<i>Negative DBA (DBA)</i>	Célula redonda espermato gonial diferenciada

En las muestras aisladas provenientes de alpacas macho adultas se observó que el DBA logró discriminar entre las SSC y las otras células redondas presentes en el testículo adulto; observándose que el $4,44 \pm 0,68\%$ son fuertemente marcadas con el DBA y corresponden a SSC de alpaca descritas como fuertemente positivas y descritas como *strong positive DBA* descrita como (sDBA+), el $37,44 \pm 3,07\%$ de células redondas débilmente positivas a las que denominamos *weakly positive* a DBA (wDBA+) que corresponden a células en diferenciación temprana y el $54,12 \pm 3,18\%$ de las células redondas negativas a DBA como diferenciadas (Valdivia et al., 2019^a).

El marcador DBA-FITC usado mediante citometría ha permitido la identificación de las células madre espermato goniales de alpaca. Usando esta caracterización se analizó la capacidad proliferativa de las SSC en cultivo *in vitro* con dos medios DMEM y STEM PRO. Al inicio las SSC fueron el 4,16% y luego de 14 días de cultivo se incrementaron a 42.28% en el medio DMEM y a 47.09% en medio STEM PRO. No mostrando diferencia significativa entre ambos medios ($p > 0,05$). En cambio si se observa diferencia significativa entre las muestras iniciales y luego del cultivo proliferativo ($p < 0,05$). Los resultados sugieren que ambos medios de cultivo son apropiados para la proliferación *In vitro* de las células madre de alpacas (Valdivia M et al., 2019b).

Por otro lado, se ha logrado congelar termo-controladamente a las células madre espermato goniales proveniente de animales adultos tanto en forma aislada así como en forma de fragmentos del tejido testicular de alpacas, diseñando medios y protocolos de criopreservación con la finalidad de conservar las células madre espermato goniales de la alpaca del Perú (Valdivia M 2019). Asimismo, hemos desarrollado congelamiento termocontrolado de células madre en forma aislada pre y post proliferación celular mediante cultivo *in vitro*. Se ha observado que es mejor conservar las células posteriormente a un periodo de proliferación celular ya que al descongelarlas se muestra un porcentaje semejante a una muestra no congelada. (Valdivia et al., 2019c). Las SSC son importantes recursos genéticos, que deben ser conservadas mediante criopreservación a -196°C con la finalidad de lograr la conservación de las características importantes de las alpacas peruanas.

CONCLUSIÓN

Es posible caracterizar las células madre espermatogoniales de alpaca desde animales adultos y manejarlas mediante cultivo celular de proliferación y diferenciación celular; así como conservarlas mediante criopreservación.

AGRADECIMIENTOS

Proyectos de Investigación: Contrato N° 123-FINCyT-ECL-2014, Proyecto CON/CON UNMSM 151001261, PIBA15A106, PROCYT 313-CONCYTEC-OAJ.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Gokhale PJ, Andrews PW. OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and non pluripotent cells. *Stem cells*. 2008;26(12):3068-74.
- Blum B, Benvenisty N. Clonal analysis of human embryonic stem cell differentiation into teratomas. *Stem Cells*. 2007;25(8):1924-30.
- Cauffman G, Van de Velde H, Liebaers I, Van Steirteghem A. Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. *Molecular human reproduction*. 2004;11(3):173-81.
- Clermont, Y (1963) The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Amer J Anat* 112:35.
- Clermont, Y. & Bustos, E. (1966). Identification of five classes of type A spermatogonia in rat seminiferous tubules mounted in toto. *Anat Rec* 154:332.
- Clermont, Y. (1966a). Spermatogenesis in man. *Fertility and sterility*, 17(6), 705-721
- Clermont, Y. (1966b). Renewal of spermatogonia in man. *American Journal of Anatomy*, 118(2), 509-524.
- Dobrinski I, (2005). Germ cell transplantation. *Seminars in reproductive medicine*; 2005: Copyright© 2005 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New.

- Dym M, Kokkinaki M, He Z. Spermatogonial stem cells: mouse and human comparisons. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. 2009;87(1):27-34.
- Escada-Rebello S, Silva A, Amaral S, Tavares R, Paiva C, Schlatt S, et al. Spermatogonial stem cell organization in felid testis as revealed by *Dolichos biflorus* lectin. *Andrology*. 2016;4(6):1159-68.
- Fayomi, A. P., & Orwig, K. E. (2018). Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem cell research*, 29, 207-214.
- Garbuzov, A., Pech, M. F., Hasegawa, K., Sukhwani, M., Zhang, R. J., Orwig, K. E., & Artandi, S. E. (2018). Purification of GFR α 1+ and GFR α 1- spermatogonial stem cells reveals a niche-dependent mechanism for fate determination. *Stem cell reports*, 10(2), 553-567.
- Izadyar F, Spierenberg G, Creemers L, Ouden Kd, De Rooij D. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-*. 2002;124(1):85-94
- Kanatsu-Shinohara M, Masanori Takehashi, Takashima S, Lee J, Morimoto H et al. Homing of Mouse Spermatogonial Stem Cells to Germline Niche Depends on b1-Integrin. *Cell Stem Cell* (2008); 3, 533-542.
- Krebsbach, P. H., & Villa-Diaz, L. G. (2017). The role of integrin α 6 (CD49f) in stem cells: more than a conserved biomarker. *Stem cells and development*, 26(15), 1090-1099.
- Lee KH, Lee WY, Kim DH, Lee SH, Do JT, Park C, et al. Vitri-fied canine testicular cells allow the formation of spermatogonial stem cells and seminiferous tubules following their xenotransplantation into nude mice. *Scientific reports*. 2016;6:21919.
- Nagano M, McCarrey JR, Brinster RL. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes. *Biology of Reproduction*. 2001;64(5):1409-16.
- Oatley JM, Brinster RL. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annual review of cell and developmental biology*. 2008; 24:263-86.
- Nash, R., Neves, L., Faast, R., Pierce, M., & Dalton, S. (2007). The lectin *Dolichos biflorus agglutinin* recognizes glycan epitopes on the surface of murine embryonic stem cells: a new tool for characterizing pluripotent cells and early differentiation. *Stem Cells*, 25(4), 974-982.

- Ogawa H, Kobayashi I, Nagasaka T, Namil Y, Hayashi S, Kadomatsu K, et al., editors. Suppression of porcine xenoantigen expression by dominant-negative effect of alpha-1, 3-galactosyltransferase (alpha-1, 3-GT) splicing variants. *Transplantation proceedings*; 2000.
- Park MH, Kim MS, Yun JI, Choi JH, Lee E, Lee ST. Integrin heterodimers expressed on the surface of porcine spermatogonial stem cells. *DNA and cell biology*. 2018;37(3):253-63.
- Ryu B-Y, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(40):14302-7
- Sá, R., Miranda, C., Carvalho, F., Barros, A., & Sousa, M. (2013). Expression of stem cell markers: OCT4, KIT, ITGA6, and ITGB1 in the male germinal epithelium. *Systems biology in reproductive medicine*, 59(5), 233-243.
- Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SK, Korver CM, Roepers-Gajadien HL, Koruji M, et al. Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. *Jama*. 2009;302(19):2127-34.
- Savvulidi, F., Ptacek, M., Vargova, K. S., & Stadnik, L. (2019). Manipulation of spermatogonial stem cells in livestock species. *Journal of animal science and biotechnology*, 10(1), 46.
- Shinohara, T., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (1999). β 1-and α 6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), 5504-5509.
- Tagelenbosch RA, de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1993;290(2):193-200.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-7.
- Ullmann U, In't Veld P, Gilles C, Sermon K, De Rycke M, Van de Velde H, et al. Epithelial–mesenchymal transition process in human embryonic stem cells cultured in feeder-free conditions. *Molecular human reproduction*. 2006;13(1):21-32.
- Valdivia M (2019). Tesis doctoral. “Efecto de la suplementación de maca roja o negra atomizada comercial combinada con un potencial crioprotector

- para células madre espermatogoniales (SSC) de alpaca *Vicugna pacos* tanto en SSC aisladas como en fragmentos testiculares. UPCH. Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor en Ciencias con Mención en Fisiología.
- Valdivia M, Castañeda-Zegarra S, Lévano G, Lazo J, Reyes J, Bravo Z, et al. Spermatogonial stem cells identified by molecular expression of PLZF, integrin $\beta 1$ and reactivity to *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA) in alpaca adult testes. *Andrologia* 2019a, Vol 151 (6): e13283.
- Valdivia M, Reyes J, Bravo Z, Cancho C, Limaymanta O, Woll P, et al. In vitro culture of spermatogonial stem cells (SSCs) isolated from adult alpaca (*Vicugna pacos*) testes identified by *Dolichos biflorus* (DBA). *Andrologia*. 2019b; e13269:7 pages.
- Valdivia M, Reyes J, Bravo Z, Gonzales G. 2019c. Solicitud de Patente. Protocolo de criopreservación para células espermatogoniales aisladas de alpaca. In institutional evaluation, assignee. INDECOPI- Perú,
- Vansandt LM, Livesay JL, Dickson MJ, Li L, Pukazhenthil BS, Keefer CL. Conservation of spermatogonial stem cell marker expression in undifferentiated felid spermatogonia. *Theriogenology*. 2016;86(4):1022-35. e3.
- Wu X, Schmidt JA, Avarbock MR, Tobias JW, Carlson CA, Kolon TF, et al. Prepubertal human spermatogonia and mouse gonocytes share conserved gene expression of germline stem cell regulatory molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(51):21672-7
- Zeng X, Miura T, Luo Y, Bhattacharya B, Condie B, Chen J, et al. Properties of pluripotent human embryonic stem cells BG01 and BG02. *Stem Cells*. 2004;22(3):292-312.
- Zhang Z, Hill J, Holland M, Kurihara Y, Loveland KL. Bovine sertoli cells colonize and form tubules in murine hosts following transplantation and grafting procedures. *Journal of andrology*. 2008;29(4):418-30.
- Zheng Y, Tian X, Zhang Y, Qin J, An J, Zeng W. In vitro propagation of male germline stem cells from piglets. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2013;30(7):945-52.
- Zheng Y, Zhang Y, Qu R, He Y, Tian X, Zeng W. Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. *Reproduction*. 2014. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0466>.

CAPÍTULO XII

PROCESOS DE REPRODUCCIÓN DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS EN EL ECUADOR

Luis Chicaiza y Edwin Pino

RESUMEN

El camélido sudamericano se desarrolla como sistemas de crianza en las comunidades campesinas con el objetivo de conservación de los páramos, sin una motivación de las instituciones involucradas en el sector agropecuario, disminuyendo paulatinamente la explotación de esta especie al no contar con la información o datos para mejorar la situación, el sector educativo por medio de dos universidades la ESPOCH y la Universidad Técnica de Cotopaxi se han involucrado en realizar investigaciones sobre la conducta de la alpaca, el comportamiento reproductivo del macho, valoración de tres métodos de extracción de semen, evaluación de las características macroscópicas y microscópicas de semen fresco, colección de semen en alpacas macho por electroeyaculador ajustado a 2 voltajes, y temas en la aplicación de biotecnologías de la reproducción en camélidos sudamericanos como evaluación de la crioconservación de ovocitos en llamas (*Lama glama*) en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Todos los temas como desarrollo de trabajo de grado, trazando una política de investigación y transferencia de tecnología de los conocimientos científicos, contribuyendo al desarrollo de capacidades de las comunidades cuyo objetivo es incrementar la productividad, concluyendo que el semen de alpaca colectado por el método de electro eyacuación se obtuvo un volumen promedio de 1.10 ml, y los ovocitos obtenidos después de súper ovulación son morfológicamente aptos para vitrificación ya que están en grado uno y se encuentran en metafase dos.

INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos son especies muy importantes en la economía de los pobladores de las comunidades alto andinas, por constituir una fuente de carne, fibra y trabajo, se desarrolla en condiciones de comunidades campesinas; pero la producción y productividad es muy baja. Hay dos ambientes naturales adecuados para la cría de alpacas en el Ecuador: los páramos y subpáramos; y los pastos naturales y mejorados, en el país no existen datos sobre la capacidad de carga de la alpaca en los varios ambientes disponibles. Sin embargo, en base de la experiencia empírica con alpacas chilenas y peruanas importadas, y datos de otros países andinos, se puede anticipar que en el páramo la carga sería de 1,2 a 2,0 alpacas por hectárea. Esta variación de cargas, refleja las diferencias en productividad de pasto, en función de variaciones en temperatura y altitud, exposición, precipitación, y fertilidad del suelo. En pastos artificiales y naturales a menor altura que el páramo se puede esperar una carga de 4 a 9 alpacas por hectárea.

Se han introducido alpacas a nuestro país desde el año 1985, por criadores particulares como Santiago Matheus y Stuart White; introdujo un grupo de 90 alpacas, en convenio con el Ministerio de Agricultura de Azuay, en octubre de 1985. Santiago Matheus importó alpacas desde Ayaviri – Puno en 1992, con el aval del presidente Fujimori, posterior a la elección de Sixto Durán Ballén, pero anterior a su posesión en agosto de ese año. Se sumaron introducciones en la ESPOCH y el Contralmirante Dueñas en la década de los 90. Instituciones como la Fundación Heifer Ecuador, el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP).

Según la FAO en el Ecuador existe una población de 6638 alpacas, en la Provincia de Cotopaxi existen 3493 alpacas, sin embargo, en el censo realizado por la Universidad Técnica de Cotopaxi y publicado por Chicaiza *et. al* 2017 en el libro *Sistematización de Experiencias Productivas en Crianza de Alpacas*, se determina una población total de alpacas de 1324, demostrando la falta de interés en el manejo y explotación de esta especie en la provincia, por la disminución significativa del número de animales.

Las limitaciones en referencia a biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos es compensado en investigaciones para mejorar los niveles de producción y productividad, tomando en cuenta que los pequeños productores

desarrollan una crianza tradicional. Iniciando trabajos en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y Universidad Técnica de Cotopaxi.

PROBLEMÁTICA

La extracción de semen con vagina artificial tiene el inconveniente de que los machos requieren ser entrenados y algunos no aceptan fácilmente el maniquí. La recolección de semen en camélidos es uno de los principales factores limitantes para el desarrollo de biotecnologías reproductivas como inseminación artificial tanto en alpacas como en llamas, así como para la evaluación de la capacidad reproductiva de los machos por lo cual es necesario diseñar técnicas de colección de semen adecuadas para dichas características.

En el Ecuador se ha iniciado el estudio relacionado a la reproducción de los camélidos sudamericanos a pesar de la falta de apoyo de las entidades gubernamentales y de los propios criadores. Sin embargo, desde las universidades por medio de los trabajos de grado se ha logrado realizar algunas tesis basadas en la teoría y protocolos de estudios realizados en otros países especialmente en el Perú, en temas como extracción de semen, comportamiento reproductivo del macho y aplicación de biotecnologías, observando un comportamiento diferente de los animales debido al sector en el que se encuentra y a la poca colaboración de los productores.

1.- Comportamiento Reproductivo del Macho en la Provincia de Cotopaxi

Las particularidades del eyaculado de estas especies son: la alta filancia, elevada viscosidad estructural y presencia de movilidad espermática oscilatoria que están determinadas por el plasma seminal (PS). A pesar de los múltiples reportes acerca del rol del plasma seminal en la fisiología reproductiva de estas especies, pueden existir efectos a nivel espermático aún no dilucidados. En trabajos realizados por la Universidad Politécnica de Chimborazo Facultad de Ciencias Pecuarias en el tema: valorización de tres métodos de extracción de semen en camélidos sudamericanos se concluye que al valorar los tres métodos de extracción de semen en camélidos sudamericanos (*Vicugna pacos*), el método de extracción seminal en el que mayor adaptación y respuesta se obtuvo fue con el método de la vagina artificial con maniquí en comparación con los dos métodos restantes, electroeyaculador y colectado directamente del conducto deferente donde no se obtuvieron resultados positivos.

La evaluación de las características macroscópicas y microscópicas de semen fresco de alpacas en la estación experimental Aña Moyocancha de la Universidad Técnica de Cotopaxi, se observó que con la aplicación de oligoelementos mejora: el volumen, concentración, motilidad, vitalidad espermática y reducción considerable de anomalías en la cabeza, cuello y cola de los espermatozoides en los eyaculados de alpacas macho tratadas con oligoelementos durante la etapa reproductiva.

Colección de semen en alpacas macho por electroeyaculador ajustado a 2 voltajes.

La investigación se desarrolló en el Centro Experimental Salache CEASA, Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi. Las variables en estudio fueron: Concentración espermática, motilidad individual, motilidad en masa y mortalidad. Con dos protocolos de extracción de electroeyaculación.

Protocolo 1

Varios estímulos de 10 voltios, mediante intervalos de 3 – 5 segundos, en donde se llegó al voltaje deseado, los estímulos fueron alrededor de 4 – 8 minutos el semen obtenido por este método fue de un volumen de $1.0 \pm 0.5\text{ml}$.

Protocolo 2

Varios estímulos de 12 voltios, mediante intervalos de 3 – 5 segundos, en donde se llegó al voltaje deseado, los estímulos fueron alrededor de 4 – 8 minutos el semen obtenido por este método fue de un volumen de $1.5 \pm 0.9\text{ ml}$ y se realizó la valoración de las características macro y microscópicas del semen.

Imagen 1. Desenvaine del pene



Imagen 2. Electroeyaculación



Fuente: Masabanda E. Chicaiza A. 2019

Imagen 3. Electroeyaculador



Imagen 4. Semen colectado



Fuente: Masabanda E. Chicaiza A. 2019

Tabla 1. Evaluación macroscópica del eyaculado a 10 voltios.

Macho	Volumen (ml)	Color	Olor	Ph
Sin arete	0.5	Blanco cristalino	Propio	7
0790	0.7	Blanco cristalino	Propio	7
3237	0.8	Blanco cristalino	Propio	7
0814	1	Blanco cristalino	Propio	7

Elaborado por: Masabanda E. Chicaiza A. 2019

Tabla 2. Evaluación macroscópica del eyaculado a 12 voltajes

Macho	Volumen (ml)	Color	Olor	Ph
Sin arete	0.6	Blanco cristalino	Propio	7
0790	1	Blanco cristalino	Propio	7
3237	1.3	Blanco cristalino	Propio	7
0814	1.5	Blanco cristalino	Propio	7

Elaborado por: Masabanda E. Chicaiza A. 2019

Tabla 3. Evaluación microscópica de eyaculado diluido con AndroMed a 10 voltajes

N° animal	Macho	Concentración x10 ⁶	Motilidad	Mortalidad		Morfo anomalías (%)
			Masal (%)	Individual	(%)	
1	Sin arete	0,5	65%	Regular	30	20
2	0790	1	80%	Bueno	20	15
3	3237	2	90%	Muy bueno	10	5
4	0814	1	90%	Muy bueno	10	10
		\bar{X} =1,12	\bar{X} =81,25		\bar{X} =20	\bar{X} =12,50

Elaborado por: Masabanda E. Chicaiza A. 2019

Tabla 4. Evaluación de las características microscópicas del eyaculado diluido con Andromed a 12 voltajes

Macho	Concentración x 10 ⁶	Motilidad	Mortalidad		Morfo anomalías (%)
		Masal (%)	Individual	(%)	
Sin arete	0,5	60%	Regular	30	25
0790	1	80%	Bueno	15	12
3237	2	90%	Muy bueno	5	6
0814	1	90%	Muy bueno	10	12
	\bar{X} =1,12	\bar{X} =80%		\bar{X} =15	\bar{X} =13,75

Elaborado por: Masabanda E. Chicaiza A. 2019

Conclusiones

El semen de alpaca colectado por el método de electro eyaculación en el primer tratamiento presentó un volumen promedio de 0.75 ml, mientras que en el segundo tratamiento se obtuvo un volumen promedio de 1.10 ml, observando así que el mayor volumen se obtuvo en el segundo tratamiento, el color de semen obtenido por el método de electro eyaculación (blanco cristalino).

2.-Aplicación de Biotecnologías de la Reproducción en Camélidos Sudamericanos

Se han realizado diferentes investigaciones en países como Perú y Chile; desarrollando alternativas en cuanto al avance de biotecnologías de la

reproducción como la inseminación artificial, la transferencia de embriones, desarrollo de protocolos de fecundación *in vitro* y criopreservación de material genético. Dando resultados favorables para la repoblación de camélidos sudamericanos en vista de ello se realizó esta investigación para incrementar bases bibliográficas en el Ecuador.

2.1.- Evaluación de la crioconservación de ovocitos en llamas (*Lama glama*) en el laboratorio de biotecnología de la reproducción animal de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

La crioconservación del material genético de camélidos sudamericanos es una alternativa para preservar y mejorar las diferentes especies de camélidos existentes en el país; esto ayuda a garantizar la calidad genética en el tiempo para experimentación y optimización reproductiva de la especie. La crioconservación del ovocito de llama se realizó aplicando la técnica de vitrificación que es un proceso rápido y sencillo. Las llamas donantes fueron superovuladas con el fin de obtener la mayor cantidad de ovocitos en metafase II; ya que el objetivo primordial de este trabajo fue el mejoramiento genético y repoblación de camélidos sudamericanos (*Lama glama*), así como evaluar la crioconservación de ovocitos.

Los resultados obtenidos fueron 20 ovocitos recolectados y 16 ovocitos vitrificados; para establecer confianza de la técnica de vitrificación se observó la viabilidad de los ovocitos congelados, la cual se realizó descongelando el 5% del total de la muestra.

Con ello se pudo concluir que la técnica de vitrificación es apropiada para crioconservar los ovocitos ya que no hubo ningún cambio en la morfología del ovocito teniendo así un 100% de viabilidad.

Total de ovocitos analizados en el laboratorio.

Cuadro 1. Total de Ovocitos

El cuadro muestra el total de ovocitos encontrados en cada uno de los ejemplares, los ovocitos y vitrificados de igual manera la calificación de los ovocitos que se basa en el aspecto del complejo ovocito cumulus que rodea al ovocito se encuentra un cumulus con capas múltiples, compacto pero translúcido además de un Ooplasma con granulación fina, densa y uniforme y cumulus ligeramente

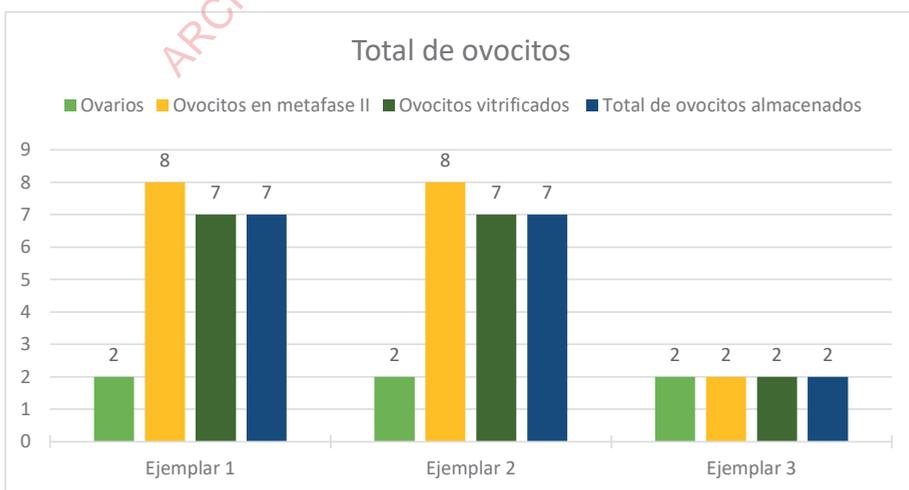
expandido, con menor número de capas que pueden cubrir la mitad de la zona pelúcida, granulaciones ligeramente más gruesas.

Especie	Ejemplar 1	Calificación	Ejemplar 2	Calificación	Ejemplar 3	Calificación
Ovarios	2		2		2	
Ovocitos recuperados	8		9		3	
Ovocitos en metafase II	8	Buena	8	Buena	2	Buena
Ovocitos Vitricificados	7		7		2	
Total de ovocitos almacenados	7		7		2	

Elaborado por: Sánchez J. Pino E. 2013

Gráfico 1. Total de ovocitos

Representación gráfica del total de la muestra de ovocitos encontrados en cada uno de los ovarios de los ejemplares (Camélido sudamericano Llama), donde se evidencia que en los 6 ovarios se pudo encontrar 20 ovocitos de los cuales 18 se encontraban en metafase II con todas sus estructuras bien definidas zona pelúcida intacta y un citoplasma homogéneo y 16 ovocitos vitricificados con características ideales.



Elaborado por: Sánchez J. Pino E. 2013

Tabla 5. Calificación de ovocitos recuperados

Se puede observar el total de ovocitos encontrados, la calificación en grados, donde 17 ovocitos se encuentran en grado uno ya que el cumulus está con capas múltiples, cumulus compacto, la totalidad el COC es clara y transparente un citoplasma homogéneo y un cumulus como 1 o algo más oscuras y menos transparente; así como 2 ovocitos en grado dos ya que se observa un ooplasma con granulación más gruesa y oscura en la periferia y cumulus menos compactos, más oscuros que en 1 o 2 además de un ovocito grado uno ya que estaba con cumulus expandidos.

OVOCITOS LLAMAS	INDICADORES
Ovocito grado 1	17
Ovocito grado 2	2
Ovocito grado 3	1
Total de ovocitos encontrados	20

Elaborado por: Sánchez J. Pino E. 2013

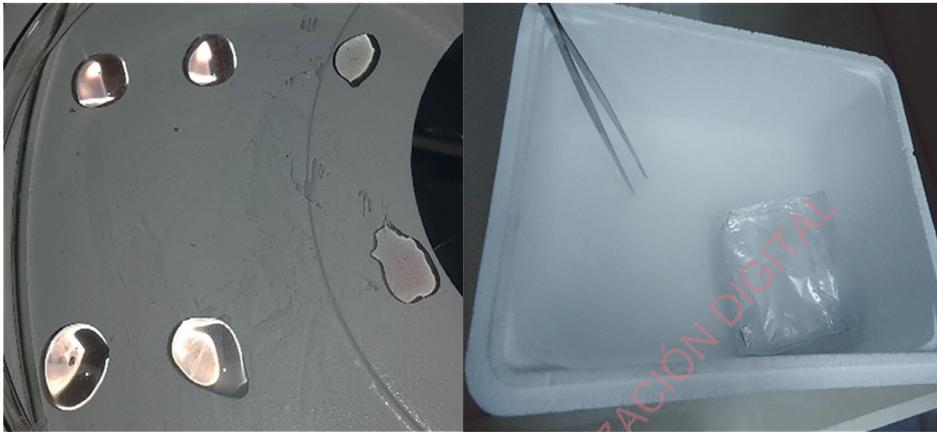
Imagen 5. Ovarios recuperados

Se pueden observar los ovarios recuperados de los ejemplares en estudio después de ser sometidos a superovulación.



Fuente: Sánchez J. Pino E. 2013

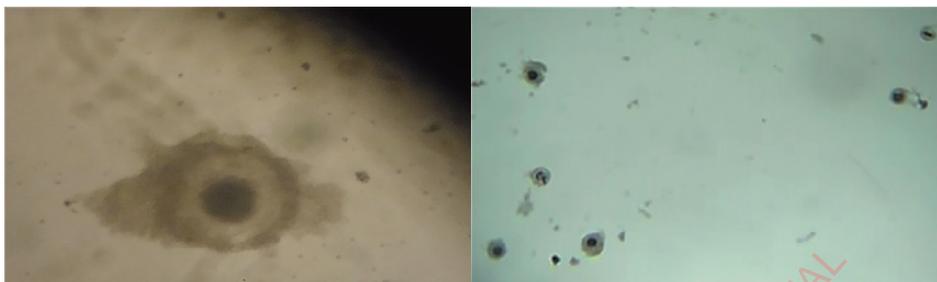
Imagen 6. Vitrificación de ovocitos



Fuente: Sánchez J. Pino E. 2013

Imagen 7. Viabilidad de ovocitos

En la imagen se puede observar la integridad del ovocito post descongelación en el cual se identifica un citoplasma homogéneo y zona pelúcida intacta.



Fuente: Sánchez J. Pino E. 2013

CONCLUSIONES

- Los ovocitos obtenidos después de súper ovulación son morfológicamente aptos para vitrificación ya que están en grado uno y se encuentran en metafase dos.
- Los hallazgos de este estudio indican que la crioconservación de ovocitos en llamas mediante la técnica de vitrificación es adecuada para preservar el material genético.
- Los ovocitos están en condición aceptable después de la vitrificación, sin ningún daño en sus estructuras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Concha J. 2019. Valorización de tres métodos de extracción de semen en camélidos sudamericanos, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba Ecuador
- Chicaiza A, Andrade J, Pino E, Pacheco M. 2017. Sistematización de experiencias productivas en crianza de alpacas. ISBN IMPRESO: 978-9978-395-52-3. Universidad Técnica de Cotopaxi
- Fumuso F. 2018. Efecto del plasma seminal sobre los espermatozoides criopreservados de llama (*Lama glama*), Universidad de Buenos Aires, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA)
- FAO 2005. Situación de Camélidos Sudamericanos en el Ecuador. Proyecto de Cooperación Técnica en Apoyo a la Crianza y Aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina.

Novoa C, Leyva V. 1996. Reproducción de alpacas y llamas. Publicación Científica
Nº 26. Lima: IVITA. 13 p

Palma A.G. 2001. Biotecnología de la reproducción Argentina Pág. 225 – 297
ISBN: 987-93-3779-8

ARCHIVO SOLO PARA VISUALIZACIÓN DIGITAL



COLEGIO DE INGENIEROS DEL PERÚ

📍 Av. Arequipa 4947, Miraflores
☎ (01) 445-6540 • 445-5540
www.cip.org.pe

ISBN: 978-9972-9465-8-5



9 789972 946585