

Recuperación de embriones en hembras de alpacas y llamas con ovulación única o múltiple

Publicado online 06 de abril de 2022

Huanca Mamani, T.¹

RESUMEN

La capacidad reproductiva de los camélidos sudamericanos es baja, con un periodo de gestación de 11,5 meses y sufren pérdidas embrionarias tempranas, por lo que la búsqueda de técnicas exitosas para lograr reproducción asistida, como inseminación artificial, superovulación, transferencia de embriones y fecundación *in vitro*, es una estrategia que está en constante desarrollo. El objetivo de este estudio fue evaluar la recuperación, la calidad y el tamaño de embriones obtenidos de alpacas y llamas donantes, de ovulación única y superestimuladas (ovulación múltiple), mediante la aplicación de 1000 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG), en la cría extensiva de la Estación Experimental Quimsachata del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA, Puno, Perú). Por una parte, en ambas especies la estimulación ovárica aumentó significativamente el número de folículos, cuerpos lúteos, tasa de ovulación y número de embriones por hembra donante. Sin embargo, la tasa de recuperación fue menor en las llamas tratadas con eCG y entre el 60 y 76% de los embriones colectados fueron clasificados como transferibles (de calidad excelente y buena) de acuerdo a la escala de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en el tamaño de los embriones en función de su calidad u origen (ovulación única o de superovulación).

Palabras clave: camélidos, eCG, reproducción, superestimulación ovárica, embriones.

ABSTRACT

The reproductive capacity of South American camelids is low, with a gestation period of 11.5 months and suffer early embryonic losses, so the search for successful techniques to achieve assisted reproduction, such as artificial insemination, superovulation, embryo transfer and in vitro fertilization, are strategies that are in constant development. The objective of this study was to evaluate the recovery, quality and size of embryos obtained from single ovulated and super-stimulated (multiple ovulation) donor alpacas and llamas, through the application of 1000 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG), in the extensive breeding of the Quimsachata Experimental Station of the National Institute for Agrarian Innovation (INIA, Puno, Peru). In both species, ovarian stimulation significantly increased the number of follicles, corpora lutea, ovulation rate and number of embryos per donor female. However, the recovery rate was lower in the eCG-treated llamas and between 60 and 76% of the embryos collected were classified as transferable (excellent and good quality) according to the International Embryo Transfer Society (IETS) scale. On the other hand, no significant differences were observed in the size of the embryos according to their quality or origin (single ovulation or superovulation).

Keywords: camelids, eCG, reproduction, ovarian superstimulation, embryos.

¹Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Programa Nacional de Innovación en Camélidos, Puno, Perú.
Correo electrónico: teodosiohuancamamani@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Los camélidos son animales estrictamente herbívoros con características reproductivas únicas, como el hecho de que presentan ovulación inducida por el apareamiento. Dentro de la familia de los camélidos se encuentra a los camellos (dromedario y bactriano), llamas, alpacas, vicuñas y guanacos. Los camellos son originarios del viejo mundo, mientras que los cuatro últimos son conocidos como los camélidos sudamericanos (Herrid *et al.*, 2017), de hábitat por encima de los 3000 m s. n. m., específicamente en zonas del altiplano en Perú, Bolivia, Argentina y Chile, característico por las bajas temperaturas y escasez de agua (Quispe *et al.*, 2009).

Para Sudamérica, desde la época de la cultura precolombina, los camélidos han significado para el hombre animales domésticos de mucha importancia, pues además de servir como fuentes de alimento, piel, cuero, y como animal de transporte de carga, son muy apreciados por su fina fibra, con la cual, hasta hoy en día, se ha alcanzado un puesto relevante en la industria textil del mundo (Quispe *et al.*, 2009; Frank 2017). Por lo tanto, su crianza doméstica es una de las actividades que más recientemente ha ejercido un impacto socioeconómico sobre todo para las poblaciones rurales de mayor pobreza y marginalización (Quispe, 2009).

En Perú, la cría extensiva de alpacas (*Vicugna pacos*) y llamas (*Lama glama*) ha ganado importancia con el procesamiento industrial y artesanal de la fibra y sus derivados. La fibra de alpaca cubre el 80% de la demanda de fibra a nivel mundial, con una producción de 3.530 toneladas generando ganancias alrededor de los 20 millones de dólares. De acuerdo al último censo, la población de alpacas está en el orden de los 3,7 millones y la de llamas en 1,2 millones de cabezas (Ministerio de Agricultura y Riego, 2015).

La capacidad reproductiva de los camélidos sudamericanos es baja debido a que su reproducción es estacional y con un periodo de gestación alrededor de los 340-345 días (Sumar, 1996). Dependiendo de la edad y del animal, tienen un inicio tardío de la pubertad y sufren pérdidas embrionarias tempranas (Fernández-Baca *et al.*, 1970), por lo que se realizan esfuerzos para lograr técnicas exitosas en la reproducción asistida, como la inseminación artificial, superovulación, transferencia de embriones y fecundación *in vitro*. Sin embargo, los desarrollos biotecnológicos son limitados, no solo por la poca disponibilidad de recursos financieros, sino por las regulaciones de protección y registro de la cría sobre estas especies (Herrid *et al.*, 2017; Forshey *et al.*, 2018).

En relación con la transferencia de embriones, se requiere cumplir con una serie de etapas en las que cada una presenta ciertas limitaciones para disponer de una técnica que genere resultados exitosos, ya que estos camélidos son ovuladores reflejos o inducidos, en los que, las señales neuronales de la cópula y proteínas seminales, como el factor de crecimiento β -neural (Adams *et al.*, 2005, 2013), son los principales factores que estimulan o inducen la secreción hipotalámica de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la cual estimula la liberación preovulatoria de la hormona luteinizante (LH), por lo tanto, la ovulación no es un evento cíclico regular (Silva *et al.*, 2020). En este sentido, se presentan como desafíos obtener una superovulación exitosa para la producción de varios embriones, la recuperación óptima de los embriones, tanto en número como en calidad y lograr una buena sincronización en la actividad ovárica entre hembras donantes y receptoras, ya

que la transferencia se realiza inmediatamente después de la recuperación de los embriones (Vaughan *et al.*, 2013).

De acuerdo a los resultados de Vaughan *et al.* (2013), con los tratamientos de superestimulación la respuesta ovárica es muy variable, señalando que, en el 33% de los casos no se logra el desarrollo de múltiples folículos, o se desarrollan de modo deficiente y anormal, lo cual afecta la fertilización. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la recuperación y la calidad de los embriones obtenidos de alpacas y llamas donantes con ovulación única y superestimuladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio experimental

El estudio se realizó en la provincia de Lampa del distrito Santa Lucía (departamento de Puno, Perú), en la Estación Experimental Quimsachata del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), situada a 4200 m s. n. m., donde se lleva a cabo la cría extensiva de alpacas y llamas.

Animales

Se trabajó con hembras donantes, 181 alpacas y 158 llamas, de tres a seis años de edad, en la temporada reproductiva entre febrero a mayo, a las cuales se les evaluaba la actividad ovárica por ultrasonografía transrectal y se seleccionaron las hembras con folículos en crecimiento cuando alcanzaron un diámetro >7 mm, que indica capacidad ovulatoria.

Seguidamente, las hembras de cada especie fueron asignadas al azar formándose dos grupos, control y con tratamiento en 87 alpacas como grupo control de ovulación simple (A-OS) y 94 para ovulación superestimulada (A-OSe); y 87 llamas grupo control de ovulación simple (LI-OS) y 71 para ovulación superestimulada (LI-OSe).

Tratamiento

A las hembras de los grupos control, una vez desarrollado el folículo dominante (>7 mm de diámetro) se les permitió el apareamiento con machos a los cuales se les confirmó previamente su fertilidad; mientras que, a las hembras del grupo para estimular se les inyectó (i.m.) 1000 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG- Folligon®, Intervet, Perú). Las hembras fueron chequeadas por ultrasonografía a partir del tercer día y fueron apareadas al día siguiente de que presentaran tres folículos >7 mm.

Recuperación de embriones

Siguiendo las recomendaciones de Huanca *et al.* (2009), siete días después del apareamiento, se realizó la colección de embriones por la técnica de lavado uterino, procedimiento que requiere tranquilizar al animal con aplicación de lidocaína al 2% (anestesia) a nivel epidural entre las vértebras sacra y coccígea.

El lavado uterino se realizó empleando un catéter Foley N.º 16 con una solución tampón de fosfato salino y antibiótico, creándose una corriente de arrastre por los cuernos uterinos, y el líquido de retorno se pasó por un filtro EmCon (Agtech) para recuperar los embriones.

Posteriormente, con una lupa estereoscópica (20x) y platina atemperada a 25 °C, se clasificaron los embriones de acuerdo

a la escala del manual de la IETS (International Embryo Transfer Society) en excelente, bueno, regular y pobre, dependiendo de las cualidades morfológicas externas (Stringfellow y Givens, 2011).

Procesamiento de datos

Las variables para evaluar la determinación de la efectividad de la recuperación de embriones en ambas especies de camélidos fueron número de folículos, cuerpos lúteos (CL) y embriones por hembra donante; tamaño de folículos, CL y embriones; tasas de ovulación (número de hembras con CL/ número de hembras con folículo >7mm) y de embriones recuperados (número de embriones recuperados/número de CL observados por medio de ultrasonografía).

Para establecer la significancia estadística en la comparación de medias observadas, se aplicó la prueba de rangos múltiples de Duncan con los niveles de confianza del 95 y 99%, y para determinar la relación entre el tamaño de los embriones recuperados con la calidad y tipo de ovulación (si fue natural o estimulado) se empleó la prueba de Chi cuadrado de Pearson con 95% de confianza.

RESULTADOS

Por una parte, los números promedio de folículos y CL, en los grupos control (que representan la ovulación natural), en todos los casos fueron menores ($p < 0,01$) a los observados en los grupos tratados con eCG en ambas especies (tabla 1).

Por otra parte, no se observaron diferencias ($p > 0,05$) en el diámetro promedio de los folículos entre grupos de ambas especies; sin embargo, el diámetro promedio de los CL en las alpacas fue mayor ($p < 0,01$) en hembras superestimuladas comparado con hembras de ovulación simple. Esta diferencia no fue observada en las llamas. La tasa de ovulación varió significativamente con el tratamiento de eCG en ambas especies, donde eCG provocó un aumento significativo alrededor del 10% comparado con la ovulación única.

Finalmente, si bien el número promedio de embriones recuperados por hembra donante fue mayor en las hembras estimuladas, las tasas de recuperación fueron significativamente menores ($p < 0,01$) solo en las llamas.

Al evaluar la calidad de los embriones recuperados de acuerdo a la clasificación de la IETS (figura 1), se observó mayoría con calidad excelente y buena en alpacas y en llamas, mayoría de embriones de calidad excelente y regular. Estadísticamente, no se observaron diferencias significativas entre los grupos ($p > 0,05$). Asimismo, no se observó relación entre el tamaño y la calidad del embrión, como tampoco entre el tamaño del embrión y tipo de ovulación, si fue natural o superestimulación ($p > 0,05$; figura 2).

DISCUSIÓN

Los estudios de reproducción asistida en camélidos se han visto favorecidos con el seguimiento de los ciclos ováricos por ultrasonido y por los ensayos hormonales, como esfuerzos dirigidos a la estandarización de protocolos exitosos para la superovulación y transferencia de embriones, con la intención a futuro, de mejorar la genética y garantizar preñeces a término con el fin de contribuir en el mantenimiento de sus poblaciones (Pacheco *et al.*, 2016; Herrid *et al.*, 2017; Ascencio *et al.*, 2019; Skidmore *et al.*, 2019). Como razones que motivaron este estudio, en el que se comparó la respuesta ovárica y la calidad de embriones en alpacas y llamas, a las que se les hace el seguimiento en condiciones naturales, que se llamó ovulación simple y ovulación múltiple (superovulación) por estimulación hormonal.

Inicialmente, la estimulación realizada con eCG fue efectiva, aumentando significativamente el número de folículos, CL y el porcentaje de ovulación, tanto en alpacas como en llamas. Si bien aumentó el número de embriones por hembra donante, la tasa de recuperación fue menor en las hembras tratadas con la hormona, particularmente en las llamas. Resultados similares fueron reportados por Vaughan *et al.* (2013), quienes obtuvieron un 66% de recuperación de embriones en alpacas que ovularon naturalmente y un 41% en el grupo estimulado. Estos resultados concuerdan con lo observado por Huanca *et al.* (2009) en llamas, quienes obtuvieron tasas del 73% de recuperación en donantes simples y 48% en las donantes estimuladas con eCG. Ahora bien, en cuanto a la recuperación de embriones en donantes con única ovulación, varios son los autores que con la técnica de lavado con PBS reportaron por-

Características	Alpacas				Llamas			
	Natural		Superestimuladas		Natural		Superestimuladas	
	n	Promedio ± DE	n	Promedio ± DE	n	Promedio ± DE	n	Promedio ± DE
N.° de folículos/donante	87	1,0 ± 0,0 b	94	7,7 ± 4,8 a	87	1,0 ± 0,0 b	71	8,0 ± 4,4 a
Diámetro de folículos (mm)	87	9,2 ± 1,8 a	94	9,6 ± 2,1 a	87	10,1 ± 2,3 b	71	9,3 ± 1,6 a
N.° de cuerpos lúteos/donante	70	1,0 ± 0,0 b	88	5,5 ± 3,6 a	73	1,0 ± 0,0 b	69	6,8 ± 4,0 a
Diámetro de cuerpos lúteos (mm)	70	10,7 ± 1,7 b	88	12,9 ± 3,6 a	73	11,3 ± 1,9 a	69	12,1 ± 2,2 a
Ovulación (%)	70	80,5 a	88	93,6 b	73	83,9 a	69	97,2 b
Número de embriones/ donante	51	1,0 ± 0,0 b	63	2,5 ± 1,7 a	43	1,0 ± 0,0 b	30	4,0 ± 3,4 a
Recuperación embriones (%)		72,9 a		71,6 a		58,9 a		43,5 b

Tabla 1. Respuesta ovárica de alpacas y llamas de los grupos control y superestimuladas.

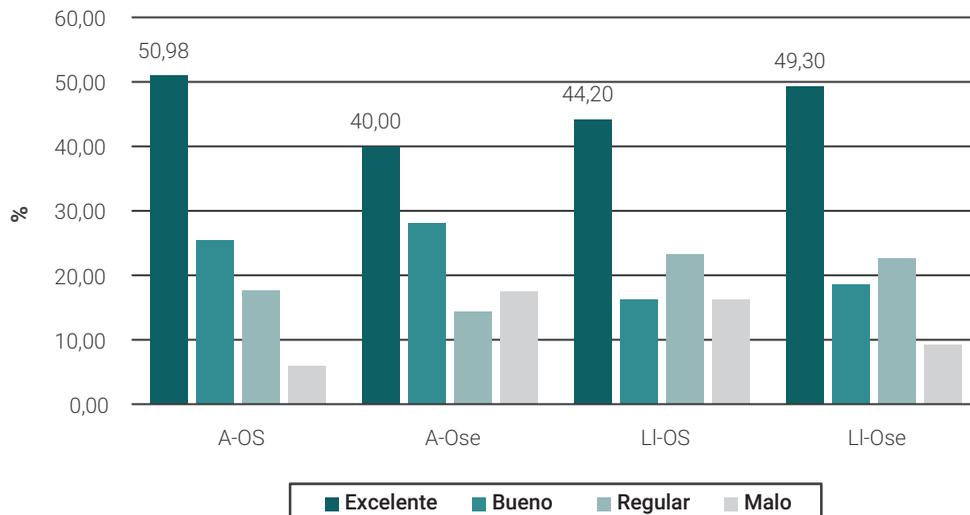


Figura 1. Calidad de embriones recuperados de alpacas y llamas donantes de los grupos, control y superestimuladas. *No se observaron diferencias significativas entre los grupos, $p > 0,05$.

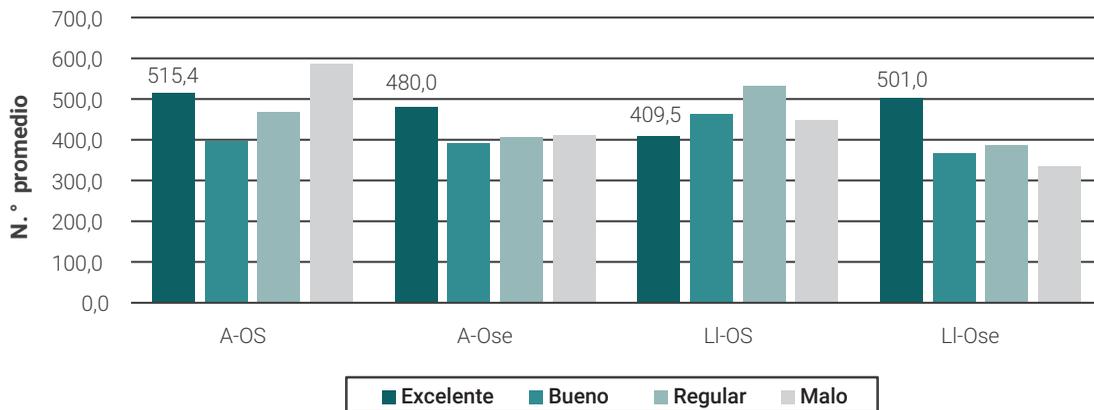


Figura 2. Tamaño (micras) y calidad de los embriones (escala IETS) en alpacas y llamas donantes de los grupos control y superestimuladas. *No se observaron diferencias significativas entre los grupos, $p > 0,05$.

centajes de recuperación entre 60 y 78% (Huanca *et al.*, 2009; Vaughan *et al.*, 2013; Forshey *et al.*, 2018; Asensio *et al.*, 2019; Pacheco *et al.*, 2016), indicando efectivamente que es el máximo esperado con este procedimiento.

Por un lado, resultados contrarios refiere el estudio de revisión de Ratto *et al.* (2015), quienes señalaron que con el uso de eCG en combinación con LH, se pudo obtener hasta 5 embriones por donante. Sin embargo, el número promedio de CL fue 7, menos de lo obtenido en este estudio. Por otro lado, si bien varios autores han utilizado combinación de hormonas, en el caso de los camélidos, con hembras que ovulan cuando se aparean, se observan respuestas muy variables y alrededor de un 20% de las hembras tratadas no responde a la superestimulación ovárica (Skidmore *et al.*, 2019), tal como se observó en este estudio.

En cuanto a la calidad de los embriones, en el presente trabajo se obtuvo mayoría de embriones con calidad excelente y buena, demostrando que esta técnica de lavado uterino, no maltrata estas células, resultados que concuerdan con lo se-

ñalado por otros autores, en los que entre el 60 y 80% de los embriones colectados son transferibles, es decir, de calidad entre excelente y buena (Vaughan *et al.*, 2013; Pacheco *et al.*, 2016; Ascensio *et al.*, 2019).

La calidad de los embriones no estuvo relacionada con su tamaño ni con la administración de la hormona en el grupo de donantes estimuladas. Similares conclusiones fueron informadas por Vaughan *et al.* (2013), aunque en ese trabajo los autores obtuvieron embriones de mayor diámetro. Además, es importante establecer que ambas especies (alpacas y llamas) respondieron de forma similar a la estimulación ovárica tanto en calidad como en número de embriones colectados. Estudios relacionados que comparan diversos tópicos de los procesos reproductivos entre las alpacas y las llamas han coincidido en que comparten dichas características, no encontrándose diferencias entre estas especies (Mamani *et al.*, 2013; Skidmore *et al.*, 2019).

Aún hoy, es necesario que se sigan impulsando estudios en esta área, en la búsqueda del procedimiento más económico,

productivo y viable de aplicación, pues garantiza una mejora genética de las especies y contribuye al mantenimiento de sus poblaciones, las cuales han estado en peligro de extinción y, además, facilita su empleo sustentable para el fortalecimiento de la economía de los países que crían estas especies.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, G.P.; RATTO, M. 2013. Ovulation-inducing factor in seminal plasma: A review. *Animal Reproduction Science* 136, 148-156. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.004>
- ADAMS, G.P.; RATTO, M.; HUANCA, W.; SINGH, J. 2005. Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biology of Reproduction* 73, 452-457. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.040097>
- ASCENCIO, S.J.; HUANCA, L.W.; TURÍN, V.J.; MAMANI, M.C.; CORDERO, R.A.; HILARI, O.F. 2019. Efecto del estadio de desarrollo de la onda folicular sobre la respuesta ovárica y tasa de recuperación y calidad de embriones en alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 30, 745-752. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i2.16066>
- FERNANDEZ-BACA, S.; HANSEL, W.; NOVOA, C. 1970. Embryonic mortality in the alpaca. *Biology of Reproduction* 3, 243-251. <https://doi.org/10.1093/biolreprod/3.2.243>
- FORSHEY, B.S.; MORAES, C.R.; LAKRITZ, J.; PINTO, C.R.F.; COFFMAN, E.; SCHANBACHER, B.J.; PLACE, N.J.; COUTINHO DA SILVA, M.A. 2018. Embryo production by superovulation and dual siring in alpacas (*Vicugna pacos*). *Small Ruminant Research* 162, 63-68. <https://doi.org/10.1016/j.smaillumres.2018.03.006>
- FRANK, E.N. 2017. Comercialización de fibras de camélidos sudamericanos. Serie Documentos Internos SUPPRAD N.º5, Red SUPPRAD, Universidad Católica de Córdoba, Argentina.
- HERRID, M.; VAJTAC, G.; SKIDMORE, J.A. 2017. Current status and future direction of cryopreservation of camelid embryos Author links open overlay panel. *Theriogenology* 89, 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.10.005>
- HUANCA, W.; CORDERO, A.; HUANCA, T.; CARDENAS, O.; ADAMS, G.P.; RATTO, M.H. 2009. Ovarian response and embryo production in llamas treated with equine chorionic gonadotropin alone or with a progestin-releasing vaginal sponge at the time of follicular wave emergence. *Theriogenology* 72, 803-808. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.05.019>
- MAMANI, C.R.; HUANCA, M.T.; PACHECO, C.J.; ZAPANA, V.R.; CONDORI, R.N. 2013. Tasa de ovulación utilizando liberador de Gonadotropinas y plasma seminal en alpacas y llamas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 24, 194-198. <https://doi.org/10.15381/rivep.v24i2.2493>
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO. 2015. Situación de actividades de crianza y producción de camélidos sudamericanos. 1-36. (Disponible: <https://www.midagri.gob.pe/portal/40-sector-agrario/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-produccion/298-camelidos-sudamericanos?start=6> verificado: 11 de marzo de 2019).
- PACHECO, J.; VÉLEZ, V.; PEZO, D. 2016. Evaluación de la Eficiencia de la Transferencia de Embriones Inter especie entre Alpacas y Llamas Obtenidos por Ovulación Simple. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 27, 64-69. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v27i1.11464>
- QUISPE, E.C.; RODRÍGUEZ, T.C.; IÑIGUEZ, L.R.; MUELLER, J.P. 2009. Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. *Animal Genetic Resources Information* 45, 1-14. <https://doi.org/10.1017/S1014233909990277>
- RATTO, M.H.; SILVA, M.; HUANCA, T.; CORDERO, A.; HUANCA, W. 2015. Inducción de superpoblación en camélidos. *Spermova* 5, 253-257. <http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.45>
- SILVA, M.; PAIVA, L.; RATTO, M.H. 2020. Ovulation mechanism in South American Camelids: the active role of β -NGF as the chemical signal eliciting ovulation in llamas and alpacas, *Theriogenology* 150, 280-287. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.078>
- SKIDMORE, J.A. 2019. The use of some assisted reproductive technologies in old world Camelids. *Animal Reproduction Science* 207, 138-145. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.06.001>
- STRINGFELLOW, D.; GIVENS, D. 2011. Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. 4.ª ed.: International Embryo Transfer Society. Illinois, EUA. 185 p.
- SUMAR, J.B. 1996. Reproduction in llamas and alpacas. *Animal Reproduction Science* 42, 405-415. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01538-2](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01538-2)
- VAUGHAN, J.; MIHM, M.; WITTEK, T. 2013. Factors influencing embryo transfer success in alpacas. A retrospective study. *Animal Reproduction Science* 136, 194-204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.010>