

---

# MEMORIAS

---



---

## XXXVII REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA ASOCIACIÓN PERUANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL

---



# XXXVII REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA ASOCIACIÓN PERUANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL

DEL 22 AL 24 DE OCTUBRE DE 2014

ABANCAY

Editor

Dr. Nilton César Gómez Urviola

Editor adjunto

M.V.Z. Mauro León Curillo Tacuri

Colaboran:

Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac (UNAMBA)

Asociación Peruana de Producción Animal (APPA)

## EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE EMBRIONES PRODUCIDOS POR FERTILIZACIÓN *in vitro* EN ALPACAS (*Vicugna pacos*)

Mijaíl Contreras<sup>1</sup>, César Olaguivel<sup>2</sup>, Mary Luz Naveros<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga E.F.P de Medicina Veterinaria  
Email: micohu948@hotmail.com

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Estación Experimental Agraria  
Canaán

### INTRODUCCIÓN

La alpaca (*Vicugna pacos*) constituye un recurso genético de gran importancia social, económica, cultural y científica para el Perú y en algunas zonas como en la región de Ayacucho, estas se localizan entre los 4000 y 4800 msnm. En el Perú, los camélidos sudamericanos probablemente constituyen el único medio de utilización productiva de las extensas áreas de pastos naturales de zonas alto andinas, donde no es posible la agricultura ni la crianza económica de otras especies de animales domésticos. Estos animales convierten con inusual eficiencia, los pastos pobres de estas alturas en productos de alta calidad como son la fibra y la carne. En la actualidad, la explotación de camélidos sudamericanos se lleva a cabo bajo sistemas tradicionales no siempre eficaces, agudizando problemas de morbilidad, mortalidad y baja eficiencia reproductiva, donde las tasas de natalidad anual en la mayoría de explotaciones alpaqueras es del orden del 50%, con índices de fertilidad y preñez inferiores a 65% y 60% respectivamente, con un reemplazo inadecuado para la reproducción, desconocimiento de la fisiología reproductiva e inapropiado empleo de reproductores en el apareamiento. La aplicación de biotecnologías reproductivas, podría contribuir rápidamente a superar estos bajos índices reproductivos logrando la multiplicación de animales de alto valor productivo formando núcleos genéticos que puedan proveer reproductores. La fertilización *in vitro* podría apoyar con el avance en el mejoramiento genético del sector alpaquero. Los resultados obtenidos señalan que el desarrollo de protocolos de FIV deberán ser una de las prioridades de investigación, en forma sistemática y conjuntamente con la transferencia de embriones permitirán contribuir a diseñar alternativas tecnológicas para los programas de mejoramiento genético en los camélidos domésticos y en base a los resultados obtenidos, evaluar la posibilidad de su aplicación en camélidos no domésticos (Del Campo *et al.*, 1994). El objetivo del presente trabajo fue: Evaluar la calidad de embriones producidos a partir de la fertilización *in vitro* en alpacas (*Vicugna pacos*).

### MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán – Ayacucho a una altitud de 2735 msnm. Las muestras de ovarios y testículos de alpacas fueron colectados del Camal Municipal de Pilpichaca, Provincia de Huaytará, Departamento de Huancavelica a 4092 msnm, los ovarios fueron trasladados en un termo con solución salina fisiológica y gentamicina 1 mL/ 1 litro de solución a una temperatura de 37 °C. En el laboratorio, se lavaron tres veces con solución salina fisiológica (SSF) al 0.9% más antibiótico a una temperatura de 37 °C, para eliminar la sangre y adherencias, los ovarios se depositaron en un vaso precipitado de 50 mL con SSF y se mantuvo atemperada en baño maría hasta finalizar la aspiración de todo los ovarios. La recuperación de ovocitos fue de ovarios que tuvieron folículos mayores de 3mm y menores de 8 mm con aguja N° 21 G, el líquido folicular aspirado fue depositado en un tubo falcón de 15 mL a 37°C, terminado la aspiración se esperó 15 minutos para la sedimentación de los ovocitos, y se eliminó el sobrenadante obteniendo 2 a 3 mL de precipitado, este fue depositado sobre placas Petri. La selección de ovocitos se realizó con un estereoscopio y una platina térmica incorporada a 37.5 °C, se seleccionaron ovocitos de categoría I y II descartando aquellos que tuvieron menos de una capa de células de cúmulus, con cúmulus muy oscuros. La maduración de ovocitos fue por 32

horas a una temperatura de 37 °C, 5% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, transcurrido las 32 horas de maduración se observó la expansión de las células de cumulo. Para la Fertilización *in vitro*, se procedió a recuperar y seleccionar espermatozoides mediante la técnica de Percoll y Swin up. El cultivo de embriones se desarrollo pasado las 18 horas de fertilización, para ello se retiró la placa multipocillos que contenía los cigotos y se removió las células de cúmulo por pipeteo, se lavó 2 veces en medio de manipulación en una placa de 30 mm y finalmente fueron depositados en una placa multipocillos que contenía medio de cultivo, en el centro de la placa multipocillos entre los well, se depositó agua destilada para mantener la humedad y fueron trasladados a la incubadora por un tiempo de 7 días. La clasificación de embriones fue pasado los 7 días de cultivo, se evaluaron y clasificaron los embriones siguiendo las reglas establecidas por la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS). Los embriones se clasificaron de excelente (1) a intransferible (5). La evaluación de los datos fue utilizando la prueba de independencia de Chi Cuadrado, y para la comparacion de métodos de capacitación de espermatozoides se utilizo t de Student, el analisis de los datos fue utilizando el programa estadístico SAS® (SAS9.2, Institute. Inc., Cary, NC, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 370 ovarios con folículos mayores de 3 mm y menores de 8 mm de diámetro, se recuperaron 1137 ovocitos, haciendo un promedio de 3.6 ovocitos/ovario de la alpaca (*Vicugna pacos*). El promedio de ovocitos por ovario fue de:  $3.60 \pm 0.70$ . Respecto a la categorización morfológica de los ovocitos, se obtuvieron ovocitos de categoría I ( $46.08 \pm 8.93$ ), categoría II ( $41.34 \pm 18$ ) y categoría III ( $12.58 \pm 3.58$ ). Los ovocitos aptos para el proceso de maduración fueron en un promedio de  $87.32 \pm 2.51$ , considerando solamente los de categoría I y II, representados por ovocitos rodeados completamente por más de dos capas de células de cúmulus así como la apariencia homogénea y compacta. La categorización morfológica fue mayor para la calidad I ( $46.08 \pm 8.93$ ), respecto a las otras categorías. Estos resultados son superiores estadísticamente en categoría I e inferiores en categoría II y III a lo encontrado por Santayana, (2011), quien reportó  $19.75 \pm 4.10$ ,  $49.49 \pm 4.99$ ,  $16.64 \pm 1.41\%$  para categoría I, II, III respectivamente. Estos resultados se deben posiblemente a que los ovarios fueron transportados a una temperatura que oscila entre los (35-38 °C), a diferencia de Santayana, (2011) quien transportó los ovarios a una temperatura ambiente (15-18 °C), ya que la temperatura de conservación durante su traslado influye directamente en la categoría de los ovocitos recuperados. El porcentaje de ovocitos a la fertilización de acuerdo al método Percoll y Swin up tuvieron un promedio de  $93.72 \pm 2.86$  y  $96.00 \pm 2.27$  respectivamente, no existiendo diferencia significativa entre ambos métodos.

En la Tabla 2. Se encontró 15.80 y 11.54% de mórulas para los métodos de capacitación de gradiente de Percoll y Swim up respectivamente. Estos resultados son superiores a los encontrados por (Gamarra *et al.*, 2008) quienes reportaron 8% de mórulas utilizando la técnica de gradiente de Percoll, este resultado se debe posiblemente a que (Gamarra *et al.*, 2008) trabajo con semen congelado e inferiores a los encontrados por (Elizabeth *et al.*, 2011) quienes reportaron 86% de mórulas utilizando una atmósfera de 90% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 5%, los resultados en el presente trabajo son inferiores a los reportados por (Elizabeth *et al.*, 2011) ya que en el presente trabajo no se utilizó mezcla de gases en el cultivo *in vitro* de embriones.

En la Tabla 3 se observa el porcentaje de blastocistos el cual fue de 8.43 y 3.89% para Percoll y Swim up respectivamente. Estos resultados son superiores en el método de gradiente de Percoll, e inferiores a Swim up a los reportados por (Mendoza *et al.*, 2008), quienes encontraron 6.3% y 6.9% para Percoll y Swim up respectivamente, estos resultados se debe posiblemente mayor en Percoll a que en el presente trabajo se utilizó medio de capacitación a diferencia de (Mendoza *et al.*, 2008), que solo utilizo medio Sper-Talp y Fer-Talp ya que el medio de capacitación influye en la fertización *in vitro*, e inferior al método de capacitación de Swim up debido a que en el presente trabajo los espermatozoides fueron refrigerados por 32 horas el cual repercute en la vitalidad y motilidad de los espermatozoides, sin embargo (Ruiz *et al.*, 2007)

reportaron 7.3 y 6.8% de blastocistos para gradiente de Percoll y Swin up respectivamente, el porcentaje de blastocistos por el método de Percoll no muestran diferencia significativa a lo encontrado con el presente trabajo de investigación, ya que en ambos casos se obtienen mayor porcentaje de blastocistos por el método de gradiente de Percoll.

En la Tabla 1. Se observa el porcentaje total de embriones obtenidos según calidad: excelente, buena, mediana, mala e intransferible las cuales fueron: 5.35, 9.53, 3.02 y 82.09% respectivamente.

**Tabla 1. Porcentaje total de embriones obtenidos por FIV según calidad.**

Número y % de embriones	Excelente	Buena	Mediana	Mala	Intransferible	Total
N	46	82	26	10	696	860
%	5.35	9.53	3.02	1.16	80.93	100.00

En la Tabla 1. Se observa el porcentaje total de embriones obtenidos según calidad de excelente, buena, mediana y mala son inferiores respecto a los intransferibles, esto se debe posiblemente a factores externos que no se pudieron controlar como la interrupción del fluido eléctrico, variación en la atmosfera de la incubadora en el momento de abrir y cerrar la incubadora, contaminación de algunos medios, los cuales repercutieron en que se incremente los porcentajes de ovocitos sin fertilizar, inhibición el desarrollo embrionario y contaminación de algunos pocillos con medio de cultivo; estos factores hicieron que incremente los porcentaje de embriones intransferibles.

De todos estos resultados se concluye que por medio de la fertilización *in vitro* en alpacas se puede obtener embriones de excelente, buena, regular y mala calidad, siendo aprovechados para la transferencia los embriones solamente los de calidad excelente, buena y regular, descartando los embriones de mala calidad.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Del Campo M.; C Del Campo, M Donoso, M Berland, R Mapletoft. 1994. *In Vitro* fertilization and development og *Lama glama* oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co culture. *Therigenology* 41: 1219-1229.
- Elizabeth Huamán, Flamel Ticlacuri, Leandra Landeo y Jaime Ruiz 2011. Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas. Universidad Nacional de Huancavelica.
- Gamarra, G, Gallegos, A., Alvarado, E., Asparrin, W. Vivanco. 2008. First *in Vitro* embryo production in alpacas (*Lama pacos*). *Reprod. Fétil.* Pag. 177–178.
- Mendoza J. Ayunque A, triviño F, Ayuque G, Landeo L y Ruiz J. 2008. Evaluación de métodos de recuperación de espermatozoides epididimarios para la fecundación *in Vitro* de ovocitos de alpaca.
- Ruiz, Correa, Soto. 2007. Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina. Instituto de Reproducción Animal - Universidad Austral de Chile.
- Santayana R. Paulo C. Tiempo de maduración de ovocitos de *vicugna pacos* “alpaca” en el desarrollo embrionario por fecundación *in vitro* Huancavelica 2011.

### Agradecimientos:

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Estación Experimental Agraria Canaán de Ayacucho por promover el desarrollo de la investigación.

**Tabla 2. Porcentaje promedio de mórulas, según tratamiento de alpaca (*Vicugna pacos*)**

Tratamiento	n	Promedio ± E.E.	Mínimo	Máximo
PERCOLL	5	15.80 ± 6.86 <sup>a</sup>	5.36	22.78
SWIN UP	6	11.54 ± 5.79 <sup>a</sup>	7.04	22.09

<sup>a</sup> Literales similares en la misma columna indican que no hay diferencia significativa ( $P \geq 0.05$ ) prueba de t de Student.

**Tabla 3. Porcentaje de blastocistos, según tratamiento de alpaca (*Vicugna pacos*)**

Tratamiento	n	Promedio ± E.E.	Mínimo	Máximo
PERCOLL	6	8.43 ± 6.04 <sup>a</sup>	3.51	16.46
SWIN UP	5	3.89 ± 1.75 <sup>a</sup>	1.89	5.81

<sup>a</sup> Literales similares en la misma columna indican que no hay diferencia significativa ( $P \geq 0.05$ ) prueba t de Student.

**Tabla 4. Porcentaje de mórulas y blastocistos obtenidos por FIV según calidad.**

	Excelente	Buena	Mediana	Mala	Total
<b>MÓRULAS</b>	26	58	17	7	108
%	24.07	53.70	15.74	6.48	100.00
<b>BLASTOCISTO</b>	20	24	9	3	56
%	35.71	42.86	16.07	5.36	100.00
<b>TOTAL</b>	46	82	26	10	164
%	28.05	50.00	15.85	6.10	100.00

#### ASSESSMENT OF THE QUALITY OF EMBRYOS PRODUCED BY *IN VITRO* FERTILIZATION IN ALPACAS (*Vicugna pacos*)

**ABSTRACT:** This work was developed in the Laboratory of Reproductive Biotechnology INIA-Canaan, Ayacucho; the objective was to evaluate the quality of embryos produced by *in vitro* fertilization (IVF) in alpacas (*Vicugna pacos*). The ovaries were collected from the Municipal Slaughterhouse of Pilpichaca (Huancavelica) and transferred in saline (0.9%) plus antibiotic, at a temperature of 37 °C. Follicular aspiration was performed, recovering 1137 oocytes from 370 ovaries, with an average of 7.2 oocytes / alpaca, oocytes used were category I and II, *in vitro* maturation was 32 hours, after which time it was made the (FIV ) withs permatozo a recovered epididymal alpacas, which were trained and selected by two methods, Percoll and Swim Up. time for the (IVF) was 18 hours, after which time the zygotes were washed and transferred to the culture medium and incubated for 7 days at 38.5 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% humidity. The percentage of morulae obtained using the Percoll method and was in tha quality Swim up excellent, good, medium and bad: 21.88, 51.56, 20.31 and 6.25% and 27.27, 56.82, 9.09 and 6.82% respectively. The percentage of blastocysts obtained using Percoll and Swim up was grades: excellent, good, medium and bad: 34.64, 36.36, 18.18 and 6.82 and 25.00, 66.67, 8.33 and 0.00% respectively. The quality of embryos produced by (IVF) was excellent (5.35%), good (9.53%), medium (3.02%), poor (1.16%) and transferable (80, 93%). It is concluded that through (IVF) in alpacas can get embryos excellent, good and medium quality.

**Keywords:** IVF embryos, Percoll, Swim up, Mórula, Blastocyst.