

EVALUACIÓN DE BLASTOCISTOS DE ALPACAS BAJO UN CONTROL DE SUPEROVULACION

Luis Vicente Olivera Marocho, Ciriaco Teodoro Zúñiga Zúñiga y Jose Ivan Quiñones García

RESUMEN

El objetivo del estudio será determinar la mejor dosis de GnRH para inducir la ovulación en alpacas superestimuladas y determinara los métodos de evaluación de los blastocistos obtenidos el trabajo se realizó entre los meses de octubre noviembre y Diciembre del 2021 en el C.E. la Raya, se superestimularan 40 alpacas vacías con acetato de buserelina para cada tratamiento, respectivamente; los que se subdividieron en dos grupos de acuerdo a la hora de beneficio a las 36 y 48 h post inducción de ovulación. La evaluación del desarrollo folicular y blastocistos será trasladados al laboratorio en medio PBS al 1% donde se realizara la descripciones macro y microscópicas de los ovocitos; la finalidad del estudio será determinar el mejor método para evaluar blastocistos luego de superovular a alpacas con folículos superestimulados.

Palabras clave: Ovocitos, Blastocistos, GnRH, superovulacion y alpacas

JUSTIFICACION

Los bajos índices reproductivos en la crianza de camélidos sudamericanos son un problema prioritario para el productor altoandino, ya que aproximadamente el 50% de hembras que son servidas en una campaña exhiben fallas para producir una cría al año (Fernández Baca, 1970).

A través de diversas investigaciones se ha logrado desarrollar la ovulación múltiple y la transferencia de embriones, provenientes de hembras con mejores características productivas y reproductivas con la finalidad de aumentar la cantidad de crías a lo largo de su vida reproductiva. A la fecha los protocolos de superovulación y transferencia de embriones continúan en investigación en los camélidos sudamericanos, a través del uso de hormonas como eCG y FSH (Correa *et al.* 1997) se logra desarrollar folículos múltiple, mientras que la la monta natural aplicación de LH, GnRH tienen efectos de producir ovulación (Ratto *et al.* 2006); por lo tanto estas hormonas son consideradas para realizar protocolos de superovulación y transferencia de embriones en camélidos sudamericanos. Los reportes sobre tratamientos superovulatorios en llamas señalan que se ha logrado colectar 50% de los embriones producidos, corroborados por la presencia de cuerpos lúteos (Del Campo *et al.*, 1995) en alpacas, Novoa *et al.*(1999), reportan el 25% de obtención de embriones, probablemente por fallas ovulares.

Posterior a la ovulación se observa la presencia de cuerpos hemorrágicos a las 36 y 48 h (Bravo, 2002) y como evidencia de ovulación esta la presencia de ovocitos en el oviducto; en caso de que no llegue a ovular el folículo puede dar lugar a un folículo hemorrágico, que si proviene de una onda folicular habitual no es considerado como caso patológico (Adams *et al.* 1991), pero al transcurrir los días el folículo hemorrágico tiende a luteinizarse (Ginther, 1979) y confundirse con un cuerpo luteo. Según las premisas la presente investigación será útil para comparar la cantidad de ovocitos colectados del oviducto y la calidad de blastocitos según métodos diversos de

evaluación.

ANTECEDENTES

La transferencia de embriones es una biotecnología reproductiva que acelera los programas de mejoramiento genético, y los resultados hasta el momento son poco satisfactorios, atribuyendo a la escasa cantidad de embriones obtenidos cuando son comparados con el número de cuerpos lúteos formados en alpacas sometidas a superovulación (Cansino, 2002; García, 2006). Al inducir hormonalmente la ovulación de folículos múltiples, la respuesta ovárica a estos estímulos externos aún merece atención por los resultados deficientes, formándose cuerpos hemorrágicos sin estigma ovulatorio provenientes de folículos que modifican su estructura al no ovular (Peiro y Col. 2001) y que posteriormente se luteinizan (Bravo, 2002). En los programas de transferencia de embriones, generalmente la presencia de los cuerpos lúteos se observa mediante ultrasonografía a los 7 días post monta, para tener referencia de la cantidad de embriones a obtener en lavados uterinos (Huanca, y Col. 2006); sin embargo, estos resultados no consideran el proceso de formación del cuerpo lúteo, si este es producto de ovulación o luteinización folicular. En caso de una ovulación el ovocito es transportado por las fimbrias del oviducto en dirección al útero con o sin fecundación (Hafez y Hafez, 2000), en ese trayecto el ovocito debe reunir características morfológicas y biomoleculares que indiquen su viabilidad para ser fertilizado, en caso de alpacas estas características son tomadas en base a la morfología de ovocitos de vacunos (Ratto *et al.* 2001). La presente investigación se centrará en evaluar la dosis adecuada de GnRH como inductor de ovulación múltiple en alpacas, así como la evaluación de ovocitos colectados del oviducto describiéndose sus características morfológicas que nos indiquen su viabilidad, y la organización macro microscópica del cuerpo hemorrágico.

HIPOTESIS

La evaluación de los blastocitos de alpacas bajo un control de superovulación permiten seleccionar, blastocitos de mejor calidad para la fertilización.

OBJETIVOS GENERALES:

Evaluar los blastocitos en alpacas bajo un control de superovulación.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Evaluar la dosis de GnRH para superovulación y obtener folículos múltiples.
- Verificar la formación y describir la macro y micro estructura de los blastocitos.
- Evaluar la cantidad y calidad de blastocitos colectados del oviducto en diferentes horas post ovulación.

MARCO TEORICO

FISIOLOGIA REPRODUCTIVA EN ALPACAS:

Los camélidos sudamericanos no muestran ciclos estruales completos, por que no se produce la ovulación si la hembra no recibe el estímulo producido por el contacto sexual con el macho, por tal razón son denominados "ovuladores inducidos" (Fernández Baca, 1971; Rodríguez, 1982) y permanecen en estado de receptividad cuando se expone al macho, pudiendo aceptar la copula hasta por 40 días consecutivos (Novoa, 1989).

Pubertad en alpacas:

La producción de hormonas ováricas se da aproximadamente a los 6 meses en llamas lo cual indica actividad ovárica (Bravo, 1997), es por ello que las hembra de los 12 a 13 meses de edad manifiestan celo similar a las alpacas adultas, ya que la actividad en los ovarios comienza a los 10 meses con la presencia de folículos de 5 mm de diámetro a más y pueden mostrar actividad sexual seguida de ovulación y fertilización,

(Novoa y Col. 1972). Se relaciona el inicio de la vida reproductiva de las hembras con el peso vivo, las hembras que alcancen peso de 33 Kg pueden ser empadradas y que por cada Kg incrementado se eleva a 5% la natalidad (Leyva y Sumar, 1981).

Dinámica folicular en alpacas

La dinámica folicular en alpacas comprende la fase folicular y fase luteal inducida; la fase folicular está dividida en base al tamaño del folículo, comprende: folículos en crecimiento, maduración y regresión. El desarrollo de cada etapa folicular es de 4 a 5 días y una onda folicular completa varía de 10 a 12 días; 2 ó 3 días antes de impulsar la regresión del folículo dominante otro folículo de las mismas características emerge y da comienzo a una nueva onda folicular (Schit, 1973; Bravo, 1995)

El efecto de la estación no es marcado sobre la dinámica folicular, por lo tanto el desarrollo folicular es continuo a través del año, encontrándose folículos de ≥ 6 mm, observados de Febrero a Marzo y también entre los meses de Agosto y Setiembre, de forma indirecta se comprueba este hecho con el nacimiento de crías en el transcurso del año (Bravo, 2002).

En hábitat natural las alpacas y llamas muestran actividad sexual estacional entre los meses de Diciembre a Marzo. En lugares donde se crían las hembras junto a los machos todo el año se reservan el empadre para la época de lluvia (Bravo and Sumar, 1989).

Onda folicular

En cada onda folicular emerge un grupo de folículos uno de los cuales (folículo dominante) continúa su crecimiento (Adams *et al.*, 1990) y el resto de folículos decrecen de tamaño y el folículo dominante crece hasta 12 ó 14 mm en llamas y en alpacas hasta 10 u 11 mm de diámetro (Taylor *et al.* 2000), luego regresa hasta 3.3 ó 2.7 mm durante 5.7 a 5.9 días, (Cansino, 2002), la onda siguiente comienza entre uno y cuatro

días de comenzada la regresión folicular (Adams *et al.*, 1990).

Al realizar laparoscopia con intervalos de 3, 5, 7 y 9 días, Bravo y Sumar, (1989) sugieren que los estadíos de crecimiento, mantenimiento y regresión de un folículo, se mantienen por 4 días en cada estadío, durando 12 días la onda folicular en la alpaca (rango de 9 - 17 días); mientras Bravo *et al.* (1990) concretaron que en llamas durante 4.5 días el folículo dominante permanece en creciendo de 3-8 mm a 10 -12 mm; para la fase estática o de madurez folicular, el folículo se mantiene en 8- 12 mm durante un promedio de 5 días; en la regresión folicular el folículo decrece de tamaño de 8- 12 mm a 3 mm, hecho que transcurre durante 4 días, siendo la onda folicular de 14 días.

El tamaño de los folículos en alpacas indica su madurez, así el folículo maduro mide de 7 a 12 mm; encontrándose folículos maduros de 8, 10 y 12 mm que representa el 38.9, 27.8 y 33.3%, respectivamente (Schit, 1973; Bravo, 1995).

En el dromedario la fase de reclutamiento se define cuando a la ultrasonografía no se presenta actividad folicular y solo se observa la aparición de folículos de 2 -3 mm; en el periodo de crecimiento folicular se observa el crecimiento de 3 a 6 folículos hasta el establecimiento de 1 ó 2 folículos dominantes; el crecimiento folicular es de 0.5 a 1 mm por día hasta que alcance 1 cm de diámetro y se hace dominante (Skidmore *et al.* 1995); existe una correlación positiva entre tamaño folicular y 17β estradiol en alpacas (Aba, 1995).

A medida que aumenta el diámetro folicular, se incrementa la concentración de estradiol desde el nivel basal de 25 pg/ml a 39 pg/ ml hasta que el folículo alcance 1.7 cm a pesar de que el folículo puede continuar con su desarrollo a mas de 2 cm, en los días sucesivos el estradiol decae a niveles basales hasta la próxima onda folicular; esta puede ser la razón por la cual los folículos de gran tamaño no ovulan cuando superan los 2 cm. (Skidmore *et al.* 1996). En caso de que las hembras no sean servidas los

niveles de progesterona se encuentran bajos (1 ng/ml), ya que no existe la presencia de un cuerpo luteo (Aba, 1995).

Clasificación de folículos

En camellos hembras Tibary and Anouassi (1997) clasifica los folículos en 4 grupos, en base a su estructura y características particulares : 1) Folículos pequeños, de 2 a 4 mm; 2) folículos preovulatorios, de 10 a 22 mm; 3) folículos en regresión que disminuyen de tamaño y 4) folículos anovulatorios, que también son denominados quistes o folículos preovulatorios grandes (23 mm). Los folículos anovulatorios tienen escasa vascularización o pared gruesa y opaca, estos folículos contienen fluido hemorrágico, sangre o fibrina.

Estimulo de desarrollo folicular:

A partir de la etapa de folículo antral, el folículo requerirá forzosamente del estímulo de la hormona estimulante del folículo (FSH) para proseguir la proliferación de las células de la granulosa y establecer, en éstas, una producción creciente de estrógenos, la acción inductiva de la FSH permitirá, posteriormente, facilitar la respuesta del folículo a la hormona luteinizante (LH) y a otros factores extracelulares (Hafez y Hafez, 2000), por lo cual se requerirá de un tratamiento hormonal a una ó a varias hembras donadoras de ovocitos o embriones, con la finalidad de conseguir la maduración del mayor numero de folículos y respectiva ovulación de estos, en ambos ovarios, en un momento previamente programado (Illera, 1994).

Tratamiento hormonal para desarrollo folicular en alpacas:

Para la inducción de desarrollo folicular múltiple en camélidos se hacen uso de hormonas tales como eCG, o FSH que se inyectan y también se induce un estado luteal con progesterona intravaginal o inyecciones diarias de esta hormona (Correa y Col.

1994; Anouassi and Ali, 1990).

Nasser *et al.* (1993), realizó tratamientos en diferentes fases del ciclo folicular e indica que la mejor respuesta ovárica se logra cuando el tratamiento superovulatorio se realizó cerca al tiempo de la emergencia de la nueva onda folicular que cuando el tratamiento se dio después o en otro momento del ciclo folicular.

Los protocolos superovulatorios son basados en remover el efecto supresor del folículo dominante dentro de los diferentes estados de la onda folicular de tal forma de coincidir con el reclutamiento de una nueva onda folicular (Ratto, 2005).

En caso de superestimulación ovárica para que los folículos desarrollen de 3 a 8-12 mm, deben transcurrir 5 días, permaneciendo luego el folículo en estado maduro por 5 días, este seguimiento fue verificado por ecografía (Bravo, 1992) y mediante laparoscopia (Pérez, 1995), estos trabajos corroboran el tiempo de maduración del folículo.

Tratamientos superovulatorio con eCG:

Novoa y Col. (1999), indican que 200 a 800 UI de eCG son dosis apropiadas para inducir desarrollo folicular múltiple, Hafez y Hafez, (2000) menciona que para obtener mayor cantidad de folículos múltiples en camélidos sudamericanos son recomendables dosis de 500 a 1000 UI de eCG, mientras que Bravo (1995), recomienda 750 UI de eCG para obtener crecimiento folicular sin repercutir en la formación de folículos quísticos.

Ratto *et al.* (2001) administraron eCG en el momento en que se inicia una nueva onda folicular, y obtuvieron el crecimiento de 17 folículos de diámetro mayor a 6 mm., datos similares reportaron Velasquez y Novoa (1999), indicando que en fase luteal luego de aplicar 1000 UI de PMSG y 1000 UI de hCG se observó la presencia de 17.8 cuerpos lúteos en ambos ovarios; Aller y Alberio *et al.* (1996) manifiestan que en llamas

ambos ovarios son igualmente funcionales cuando se realizan tratamientos hormonales.

Así también Del valle (1964) obtuvo el desarrollo de 1 a 30 folículos preovulatorios por hembra, encontrándose entre ellos: folículos polioocíticos, que en su interior contenían más de un ovocito, coincidiendo con Acosta (1960) y Pérez (1995).

Aparicio y Col. (2003), indujeron la maduración folicular con 400 UI de PMSG y obtuvieron por lo menos 2 folículos desarrollados, 24 horas después las alpacas fueron servidas con machos enteros (tiempo de cópula 15 minutos), complementado con 10 g de buserelina ó 1000 UI de hCG para asegurar la ovulación, obteniendo un promedio de 1.25 cuerpos luteos y guardando la relación con la cantidad de embriones hallados.

Combinaciones hormonales para inducir desarrollo folicular:

Chaves *et al.* (2002) combinaron en alpacas 500 UI de eCG con progesterona, y lograron desarrollar 5.2 folículos por hembra; en otro tratamiento Aller *et al.* (2002) utilizaron benzoato de estradiol, y progesterona durante 8 días, seguido por 1200 UI de eCG y lograron obtener 80% de respuesta ovárica y el número de folículos desarrollados fue de 4.2, se formaron 2.1 cuerpos luteos por hembra. Gamarra *et al.* (2007), utilizaron esponjas intravaginales de 60 mg, de acetato de medroxiprogesterona (MAP) y 2 ml de PGF₂ α , el día 7 se aplicó 6 dosis decrecientes de FSH y 300 UI de eCG (el último día) luego aplicaron 3000 UI de hCG, o 2.5 ml de GnRH en el momento de la monta, produciendo 1.3 y 0.9 cuerpos lúteos, respectivamente.

Con la presencia de progesterona endógena, se aplicó dosis crecientes de FSH durante 4 días (200 mg en total) y prostaglandina el cuarto día, dos días después se aplicó GnRH y la respuesta ovulatoria fue de 9.2 folículos por alpaca, y 4.1 cuerpo lúteos (Cervantes *et al.* 2007).

MATERIALES Y METODOS

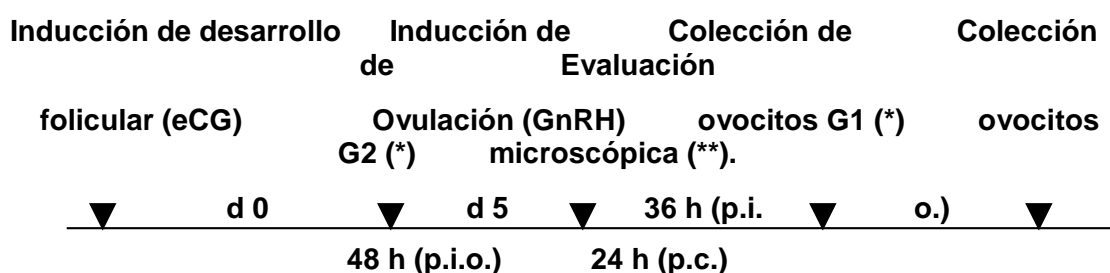
UBICACIÓN:

En el Centro experimental la Raya de la Universidad nacional del altiplano donde de procederá a realizar el estimulo hormonal, para la superovulacion el empadre y la posterior evaluación de los blastocistos. Una segunda fase experimental se realizó en el laboratorio de Histología y Embriología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano para la colección, recuento y valoración de los blastocistos.

SELECCIÓN DE ANIMALES:

Para la selección de animales se evaluara las características del aparato reproductivo de cada hembra, mediante palpación rectal, descartando aquellas alpacas preñadas.

Protocolo de superovulación:



d= días

h= horas

p.i.o.= post inducción de ovulación

p. c. = post colección

* = Evaluación macroscópica de cuerpos hemorrágicos *in situ*

** = Procesamiento de los cuerpos hemorrágicos para técnica histológica

Diseño estadístico:

Las alpacas fueron sometidas a un mismo protocolo de desarrollo folicular, evaluándose la respuesta a las diferentes dosis de GnRH en la ovulación y colección de blastocistos, serán evaluados a la prueba de ji cuadrado de independencia.

$$\chi^2_c = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	Trimestres				
	E-F-M-A	M-J	J-A-S	O-N	DIC
Revisión bibliográfica	X				
Elaboración del proyecto	X				
Aprobación del proyecto		X			
Ejecución del proyecto		X	X		
Procesamiento de datos			X	X	
Redacción				X	
Presentación					X

PRESUPUESTO

Descripción	Unidad de medida	Costo Unitario (S/.)	Cantidad	Costo total (S/.)
Cámara fotográfica	16 megapíxeles	450.00	1	450.00
Libretas de campo	Unidad	6.00	2	6.00
Cuaderno de campo	Unidad	5.00	4	20.00
lapiceros	Docena	2.00	12	24.00
Impresiones de registro de datos.	Unidad	0.10	100	10.00
Análisis y resultados de laboratorio	análisis	30.00	30	900.00
Papel A4	Millar	25.00	1	25.00
Pasajes Puno – Chuquibambilla - Puno	kilómetros	11.50	5	115.00
Alimentación de tesista	Unidades	20.00	5	1,000.00
Computadora	Unidad	2,000.00	1	2,000.00
Servicios de digitado	Unidad	2,000.00	1	2,000.00
Imprevistos	soles	300.00	1	300.00
Total				6,850.00

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aba, M. (1995). Studies on the reproductive endocrinology of llamas and alpacas from mating throughout early pregnancy. Masters Thesis. Swedish University of Agricultura Sciences , Uppsala.
- Acosta, R. L. (1960). Inducción del crecimiento folicular y de ovulación en alpacas jóvenes: Tesis Med. Vet. FMV –UNMSM. Lima.
- Adam, C.; Moir, C. and Shiach, P. (1989). "Plasma Progesterone concentration in pregnant and non-pregnant llamas (*Lama glama*). Veterinary record. 125.
- Bravo W, Sumar J. (1989). Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. Anim Reprod Sci. 21.
- Bravo, W. (1992). La fase folicular del ciclo ovárico y respuesta de la glándula pituitaria a la copula repetida en la alpaca. ALLPAK'A 2.
- Bravo, W. Stabenfeld, G. Fowler, M. and Lasley, B. (1992). Pituitary response to repeated copulation and /or GnRH administration in llamas and alpacas. Biol Rep. 47.
- Fernandez-Baca, S. (1970). Luteal function and the nature of the reproductive failures in alpaca. PhD Thesis Ithaca, N Y: Cornell University.
- Fernandez Baca, S.; Madden, D. and Novoa, C. (1970). Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca. J. Reprod Fertil. 22.
- Fernandez Baca, S. (1971). La Alpaca, Reproducción y Crianza. Rev. Inv. IVITA UNMSM Vol. 7. Lima – Perú
- Ferrer, M.; Agüero, A.; Chaves, M.; Russo, A and Rutter¹, B. (2002). Sincronización de la onda folicular mediante el uso de buserelina en la llama (*Lama glama*). InVet. 4(1).
- García, W. (2006). Superovulación en alpacas y recuperación d embriones mediante un

- método quirúrgico. IV Congreso Mundial Sobre Camélidos Sudamericanos Catamarca Argentina.
- Hafez, E.S.E. y Hafez, B. (2000). Reproducción e Inseminación en animales. Séptima edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. México.
- Hahn, J.(1992). Attempts to explain and reduce the variability of superovulation. *Theriogenology*. 38.
- Halbert, S.; Becker, D. and Szal, S. 1989. Ovum transport in the rat oviduct ampulla in the absence of muscle contractility. *Biol Reprod*. 40.
- Huanca, W., Ratto, M., Cordero, A., Santiani, A., Huanca, T., Cárdenas, O. y Adams G. 2006. Respuesta Ovarica y Transferencia de Embriones en Llamas Y Alpacas en la Zona Altoandina del Perú. IV Congreso Mundial Sobre Camélidos Sudamericanos Catamarca Argentina.
- Novoa, C.; Franco, E. Garcia, W. y Pezo, D. (1999). Dosis de gonadotropinas (ecg y hcg), superovulación y obtención de embriones en alpacas. *Rev. Inv.*
- Rawson, J., and Espey, L. (1977). Concentration of electron dense granules in the rabbit ovarian surface epithelium during ovulation. *Biol. Reprod*. 17.
- .Richards, J. S., and Bogovich, K. (1982). Effects of human chorionic gonadotropin and progesterone on follicular development .in the immature rat. *Endocrinology* 111.
- Rodriguez, J. (1982). "Revision sobre los avances logrados en la fisiología de la reproducción en llamas (*Lama glama*)". Seminario de reproducción de camélidos. INFOL. La Paz – Bolivia.
- Saumande, J. and Chupin, D. (1986). Induction of superovulation in cyclic heifers. The inhibitory effect of large doses of PMSG. *Theriogenology*. 25.
- Schit, CR. 1973. Breeding season and notes on some other aspects, of reproduction in camelids *INT ZooYoar boock*. 13
- Skidmore, L.; Billah, M. and Allen, W. (1995). The ovarian follicular wave pattern in the mated and non-mated dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *J*
- Sumar, J. (1988). Removal of the ovaries or ablation of the corpus luteum and it's effect

- on maintenance of the gestation in the alpaca and llama. *Vet. Scand.* 83.
- Sumar, J. citado por Hafez, E.S.E. y Hafez, B. (2000). Reproducción de Inseminación en animales capítulo Camelidos Sudamericanos. Séptima edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México.
- Vaughan, J.; MacMillan, K. and D'Occhio M. (2004). Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Anim Reprod Sci* 80 (4)
- Velasquez, C. y Novoa, C. (1999) Superovulación con PMSG aplicada en fase folicular y fase luteal en alpacas. *Rev. Inv. Vet. Del Perú.* Vol. 10. N°1.
- Von-Baer, A.; Von-Baer, L.; Donoso, M.; Pobrete, P.; Miranda, H. y Del Campo, M. (2003). Efecto de diferentes parámetros en llamas (*Lama glama*) y alpacas (*Lama pacos*) en un programa de transferencia de embriones. Tercer congreso mundial sobre camélidos sudamericanos. Potosí-Bolivia.
- Zambrano, Fr. (1999). Influencia de la nutrición sobre la multiovulación en alpacas huacaya. Tesis. Med. Vet. Y Zoot. UNA – Puno.
- Zeleznik, A. (1998). Luteinization. In: Knobil E, academic press. *Encyclopedia of Reproduction.* Vol 2 Ep-L.