

VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES DE ALPACAS: ESTUDIO PRELIMINAR**Vásquez, M¹; Cervantes, M¹; Cordero, A²; Cárdena, O³; Huanca, T³; Huanca, W¹.**

¹ Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ² Departamento de Nutrición, Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina; ³ Programa nacional de Camélidos, EE ILLPA – INIA – Puno
Email: whuanca2002@yahoo.com

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de un protocolo de vitrificación de embriones de alpacas sobre la morfología embrionaria *In Vitro* post descongelamiento y viabilidad *In Vivo* post transferencia. Dos alpacas hembras donadoras recibieron un tratamiento de superovulación con eCG y fueron montadas naturalmente. Siete días después se realizó el lavado uterino no quirúrgico. Se recuperaron 9 embriones en estadio de blastocisto y clasificados según lo señalado en el manual de la IETS (1998). Los embriones fueron expuestos por 5 minutos a la solución de vitrificación 1 (SV1) (0.1 M de sucrosa, 0.125 M de glucosa y 10 % de glicerol); 5 minutos en la Solución de Vitrificación 2 (SV2) (0.2 M de sucrosa, 0.25 M de glucosa, 10 % de glicerol y 10 % de etilenglicol) y finalmente transferidos a la Solución de Vitrificación 3 (SV3), (0.3 M de sucrosa, 0.375 M de glucosa, 20 % de glicerol y 20 % de etilenglicol), por 1 minuto, antes de ser cargados en pajillas de 0.25 ml y ser sumergidos en nitrógeno líquido. Cuarenta y ocho horas después, los embriones fueron descongelados y evaluados. Ocho embriones descongelados de buena calidad morfológica, fueron transferidos a 8 alpacas receptoras previamente sincronizadas; sin embargo, a la evaluación ecográfica ninguna hembra fue diagnosticada preñada. Estos resultados nos sugieren que posiblemente existan factores que no afectan la calidad morfológica pero si la viabilidad de los embriones transferidos.

ABSTRACT

The aim of the present work was evaluate the effect of embryo vitrification protocol in alpacas *In vitro* embryo morphology post warming and viability *In Vivo* after transfer. Two donor female alpacas were given a superovulatory treatment with eCG and were mated with fertile male alpacas. Seven days later was performed the nonsurgical uterine flushing. It was recovered 9 embryos in blastocyst stage, which were classified according to the IETS manual (1998). During 5 minute embryos were exposed to Vitrification Solution (VS1), containing 0.1 M sucrose, 0.125 glucose and 10% glycerol; 5 minutes in the vitrification solution 2 (VS2) with 0.2 M sucrose, 0.25 M glucose and 10 % glycerol and 10 % ethylene glycol. Finally exposed to Vitrification Solution 3 (SV3), composed of 0.3 M sucrose, 0.375 M glucose, 20 % glycerol and 20 % ethylene glycol for 1 minute, before to be loaded into 0,25 ml straws and plunged into liquid nitrogen. Forty eight hours

later embryos were warmed and evaluated. Eight good morphological quality warmed embryos were transferred to 8 recipients alpacas previously synchronized. However at ultrasound evaluation any female was pregnant. These results suggest that probably exit factors that affect the viability but not the morphology quality of transferred embryos.

Keywords: Alpaca, criopreservación, vitrificación, embryo

INTRODUCCIÓN

La criopreservación es una técnica que permite disponer y transportar embriones de animales reproductores genéticamente superiores. En nuestro país, la crianza de camélidos sudamericanos es la principal actividad socioeconómica para muchas familias altoandinas, pero que en la actualidad presentan deficientes índices de productividad en la calidad de fibra y carne. El uso de tecnologías reproductivas, como la criopreservación de embriones, podrían contribuirían al mejoramiento de estas especies e incrementar los ingresos de la población de esta zona del país.

Existen dos métodos para la criopreservación de embriones: El método convencional, que consiste en una congelación lenta y requiere de equipos para la reducción térmica y el método de vitrificación, que consiste en un protocolo de enfriamiento rápido y no requiere de equipos para el descenso de la temperatura. En ambos métodos se pueden producir daños en los embriones, pero el tipo y grado de los daños dependen probablemente del método de criopreservación empleado (Kaidi *et al.*, 2001). Una de las ventajas que tiene el método de vitrificación frente a la congelación lenta, es la menor probabilidad que ocurran daños celulares relacionados a la formación de hielo intra y extracelular; además algunos estudios han demostrado que luego de la vitrificación algunos de los cambios producidos en los embriones pueden ser reversibles (Kaidi *et al.*, 1999). Estudios realizados en ovinos, sugieren que la vitrificación es un método apropiado para la criopreservación de embriones, con tasas de preñez alrededor del 50% después de transferir embriones vitrificados (Papadopoulos *et al.*, 2002, Baril *et al.*, 2001).

Desarrollar protocolos de criopreservación de embriones de alpacas, permitiría disponer de una herramienta, que aplicado adecuadamente en un programa de mejoramiento genético, contribuiría a mejorar la calidad de las alpacas y otros camélidos sudamericanos. El presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar un protocolo de vitrificación de embriones y su posterior calidad morfológica In Vitro y viabilidad In Vivo.

MATERIALES Y METODOS

09 embriones obtenidos de dos alpacas hembras adultas fueron usados como material experimental. Las alpacas recibieron un tratamiento de superestimulación con Hormona eCG (Folligon Intervet), servicio con machos fértiles y el lavado uterino a los 7 días pos servicio, según el protocolo señalado por Huanca *et al.* (2004).

La evaluación de la calidad embrionaria se realizó en base a la clasificación señalada por la IETS (1998), Grado 1: Excelente o buena, Grado 2: Regular, Grado 3: Pobre y Grado 4: Degenerado. La evaluación se realizó con la ayuda de un estereomicroscopio

Criopreservación de embriones: Se utilizó un protocolo de vitrificación modificado al descrito por Aller *et al.* (2002). Los embriones fueron equilibrados durante 5 minutos a la solución de vitrificación 1 (SV1) que contiene 0.1 M de sucrosa, 0.125 M de glucosa y 10 % de glicerol. Luego fueron transferidos a la Solución de Vitrificación 2 (SV2) por 5 minutos, que contiene 0.2 M de sucrosa, 0.25 M de glucosa, y 10 % de glicerol y etilenglicol. Finalmente fueron transferidos a la solución de vitrificación 3 (SV3), compuesta por 0.3 M de sucrosa, 0.375 M de glucosa, 20 % de glicerol y 20 % de etilenglicol, por 1 minuto, antes de ser cargados en pajillas de 0,25 ml. Una vez cargados los embriones se procedió a sumergirlos en un tanque con Nitrógeno Líquido. Todo el proceso de vitrificación se realizó a temperatura ambiente.

Diagnóstico de Preñez: El diagnóstico de preñez de las receptoras se realizó por ultrasonografía al día 30 post transferencia.

Análisis estadístico: Las variables que se consideraron para el análisis fueron: Calidad de embriones recuperados, calidad de embriones al final de la vitrificación, calidad embrionaria después del descongelamiento, tasa de preñez en receptora.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Calidad de embriones recuperados De los 9 embriones recuperados, 7 (77,78%) fueron graduados como buena calidad y 2 (22,22%) de regular calidad (Tabla 1). Todos los embriones recuperados midieron entre 0,12 a 0,7 mm (120-700 μ). En los bovinos la calidad de los embriones parece no estar influenciada por factores tales como la edad de la donadora, número de pariciones, sexo del embrión, macho que realizó el servicio y la estación del año. Sin embargo, la superovulación de la hembra donadora parece sí influenciar, debido probablemente a los cambios hormonales y estructurales en los fluidos foliculares y de los oocitos, durante el período preovulatorio y que podría afectar la fertilización y desarrollo embrionario temprano (Callensen, 1995). Por tanto, la calidad de los embriones parece estar relacionado a la futura tasa de preñez,

como lo demuestra el estudio realizado por Abe *et al.*, (2002) en el que embriones de bovinos de excelente, buena, regular y pobre calidad resultaron en 45, 44, 29, 20 % de tasa de preñez respectivamente.

El estadio del embrión parece también influir en su calidad y por consiguiente en la tasa de preñez, habiéndose reportado mayores tasas de preñez luego de la transferencia de embriones bovinos en estadios tardíos (Callensen *et al.*, 1995). También en embriones de dromedarios (*Camelus dromedarius*) en estadio de blastocisto liberado, sometidos a congelación lenta y recuperados al día 6,5- 7,0 después de la ovulación, tuvieron una alta tasa elevada de sobrevivencia in Vitro (92 %), según su apariencia morfológica (Nowshari *et al.*, 2005). Por otro lado, en algunos estudios se ha observado que los diferentes estadios de desarrollo de embriones producidos in vivo reflejan variaciones biológicas, mas no diferencias en su viabilidad (Lindner and Wright, 1983). Estos resultados discrepantes nos permiten inferir, mas no asegurar que la viabilidad de embriones criopreservados estaría influenciado por la calidad y el estadio embrionario.

Tabla 1. Calidad de los embriones recuperados

Calidad embrionaria	n	Porcentaje
Grado 1 (Bueno)	7	77,78
Grado 2 (Regular)	2	22,22
Total	9	100

Cambios embrionarios al final del proceso de vitrificación Durante la exposición a la solución de vitrificación se observó como único cambio anormal el oscurecimiento de tres embriones, dos de los cuales fueron los de regular calidad y uno de buena calidad. Este oscurecimiento de las blastómeras embrionarias podría deberse a la picnosis de los núcleos posiblemente dañadas y que estarían entrando en proceso de lisis celular. Esto lo podemos atribuir a la prolongada exposición (1,56 min, óptimo = 1 min) de los embriones a la SV3, la cual contiene altas concentraciones de crioprotectores. Por tanto, la calidad embrionaria previa a la vitrificación podría haber influenciado en la presentación de cambios morfológicos anormales. También la permeabilidad de las células al crioprotector parece estar relacionado al estadio y especie del embrión y dependiendo de ello sería un factor que podría provocar fallas osmóticas (Kasai *et al.*, 1990). La permeabilidad a los

crioprotectores. Así pues, se ha reportado que el etilenglicol es más permeable a mórula de ratón y el glicerol lo es para embriones de ratón de una célula (Kasai, 1996).

También el estudio realizado por Pedro *et al.* (2005) encontraron que el patrón de permeación no cambia desde oocitos maduros hasta el estadio de 16 células, sin embargo, en el estadio de mórula, la permeabilidad a glicerol y a etilenglicol incrementó marcadamente. Lo cual puede deberse a que la preparación para la compactación empieza en este estadio, y con ello se incrementa varias actividades fisiológicas. Todos estos cambios ultraestructurales producidos dentro de las blastómeras podrían influenciar en el desarrollo del embrión y en su supervivencia después de la transferencia. Esto indicaría que la sensibilidad del embrión a la criopreservación varía con el estadio y especie, y sería un inconveniente a superar para una aplicación práctica del método de criopreservación.

Cambios embrionarios post descongelación El proceso de descongelamiento también es un momento en el cual los embriones pueden sufrir daño. Se descongelaron 8/9 embriones (un embrión no se logró recuperar, posiblemente se destruyó durante el proceso de vitrificación), cinco de los cuales se restablecieron y tres sufrieron cambios anormales (Tabla 2). Uno de los cambios fue la presencia de vesículas transparentes, que posiblemente sean gotas lipídicas. La cantidad de lípidos en el citoplasma de los embriones se asocian a una disminución en el metabolismo de las mitocondrias cuando son inmaduras, pero en el caso del presente estudio este cambio podría ser la consecuencia del daño producido a esta organela. Con el daño a las mitocondrias disminuye también el consumo de O₂ y la producción de CO₂, pudiéndose afectar la viabilidad del embrión. Gotas lipídicas también han sido observadas en embriones de baja calidad, siendo estos más sensibles a los procedimientos de criopreservación (Abe *et al.*, 2002).

Otro de los cambios anormales fue la descamación de blastómeras periféricas en dos de los embriones, lo que podría atribuirse, al igual que en embriones bovinos, a la pérdida de las conexiones intercelulares en las células trofoblásticas provocado por la vitrificación (Vajta *et al.*, 1997). Finalmente se observó un embrión que permaneció arrugado, debido probablemente a la destrucción irreversible de los filamentos de actina, constituyentes del citoesqueleto de todas la células eucariotas, producto de daño osmótico, como se ha observado que sucede con embriones porcinos, y que no permitiría que el embrión se restablezca (Lang *et al.*, 1998).

Según lo reportado por Men *et al.*, (2005) un alto porcentaje de embriones vitrificados y que presentaron cambios morfológicos se restablecen luego de un cultivo in Vitro. Sin embargo en el

presente estudio los cambios que sufrieron los embriones luego de mantenerlos durante 2,57 hrs fueron irreversibles.

Tabla 2. Calidad embrionaria inicial y características morfológicas post descongelación

Calidad embrionaria	n	Características morfológicas post descongelación	Observaciones
Buena	7	Blastómeras transparentes o con gotas lipídicas (*), blastómeras descamándose (*), embrión arrugado (*). Embrión se restablece o recupera su forma inicial (&).	(*) Cambios embrionarios anormales (n=3) (&) Cambios embrionarios normales (n=4)
Regular	1	Blastómeras descamándose (*)	(*) Cambios embrionarios anormales (n=1)

No se observó un embrión post descongelación, posiblemente fue destruido durante el proceso

Tasa de Preñez en hembras receptoras: Ninguna de las alpacas receptoras resultó preñada luego de transferirle los embriones vitrificados y descongelados, a pesar de que la calidad de la mayoría de los blastocistos fue buena. Este resultado podría deberse al efecto tóxico del mayor tiempo de exposición del crioprotector, que se encuentra en mayor concentración en la última solución de vitrificación.

Los resultados del presente estudio nos sugieren que si bien es posible la vitrificación de embriones de alpacas, con embriones morfológicamente normales post descongelamiento, aún se requieren estudios que permitan obtener una viabilidad In Vivo post transferencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Abe, H; Yamashita, S; Satoh, T; Hoshi, H. 2002.** Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev* 61,57-66.
2. **Aller, J.; Rebuffi, G.; Cancino, A.; Alberico, R. 2002.** Successful transfer of vitrified llama (*Lama glama*) embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 73, 121 –127.

3. **Baril,G; Traldi, A-L; Cognié, Y; Lebeouf, B; Beckers, J; Mermillod, P. 2001.** Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*.56: 299-305.
4. **Callensen, H.; Lovendahl, P.; Bak, A.; Greve, t. 1995.** Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. *J Anim. Sic.* 73, 1539 – 1543.
5. **Huanca, W; Ratto, M; Santiani, A; Cordero, A; Huanca, T. 2004.** Embryo transfer in camelids: study of a reliable superovulatory treatment in llamas.3th Internacional Meeting on European Camelids – Gottingen – Alemania.
6. **International Embryo Transfer.1998.** Manual of the International ET society. 3rd ed. Savoy. IL, USA.
7. **Kaidi, S; Van Langendonekt, A; Massip, A; Dessy, F; Donnay, J. 1999.** Cellular alteration alter dilution of cryoprotective solutions used for vitrification of in Vitro produced bovine embryo. *Theriogenology* 52, 515-525.
8. **Kaidi,S.; Bernard, P.; Lambert,A.; Massip,A; Dessy, F.; Donnay, I. 2001.** Effect of conventional controlled-rate freezing an vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced in vitro.
9. **Kasai, M. 1996.** Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim Reprod Sci* 42, 67-75.
10. **Kasai, M; Komo, J; Takakamo, A; Tsudera, H; Sakurai, T; Machida, T. 1990.** A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* 89, 91-97.
11. **Lang, F; Busch, G; Ritter, M; Volkl,H; Waldegger, S; Gulbins, E. 1998.** Functional significance of cell volume regulatory mechanism. *Physiol Rev* 78, 247-305.
12. **Lindner,G.; Wright, W. 1983.** Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20: 407. Abstract.

13. **Men H; Agca, Y; Mullen, S. 2005.** Osmotic tolerance of in vitro produced porcine blastocysts assessed by their morphological integrity and cellular actin filament organization. *Cryobiology* 51, 119-129.
14. **Nowshari, M.; Ali, S.; Saleem, S. 2005.** Offspring resulting from transfer of cryopreserved embryos in camel (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology*. 63(9):2513-22.
15. **Papadopoulos, S.; Rizos, D.; Duffy, P.; Wade, P.M.; Quinn, K.; Boland, M.P.; Lonergan, P. 2002.** Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts.
14. **Pedro, P; Yokoyama, E; Zhu, S; Yoshida, N; Valdez, D; Tanaka, M; Edashige, K and Kasai, M. 2005.** Permeability of Mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. *J Reprod Dev* 51, 235-246.
16. **Shea, B. 1981.** Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology* 15: 31. Abstract.
17. **Vajta, G; Hyttel, H; Callensen. 1997.** Morphological changes of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification, in straw direct rehydration, and culture. *Mol Reprod Dev* 48, 9-17.