

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Bipartición de embriones de *Vicugna pacos* “alpaca”
producidos *in vitro* en diferentes etapas de desarrollo.
Ayacucho, 2011.**

**TESIS PARA OBTENER TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO
EN LA
ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

Bach. CORTEZ POLANCO, JENIN VÍCTOR

AYACUCHO - PERÚ

2011

DEDICATORIA

A Eduarda Daniela Polanco Ríos

ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
RESUMEN	iv
INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	03
2.1. Antecedentes	03
2.2. Aspectos generales sobre la bipartición de embriones	05
2.3. Técnicas de clonación de embriones	06
2.3.1. Bipartición o división de embriones	07
2.3.2. Separación y cultivo de blastómeros aislados	09
2.3.3. Transferencia nuclear	11
2.4. Ventajas y desventajas de las técnicas de clonación	19
2.5. Aplicaciones de la clonación de embriones	21
2.5.1. Clonación de embriones por generación múltiple	22
2.5.2. Aspectos comerciales de la clonación de embriones	24
2.5.3. Aplicación de la clonación en la conservación de especies	25
2.6. Limitaciones de la bipartición de embriones	26
2.7. Proceso de producción de embriones <i>in vitro</i>	27
2.7.1. Obtención de ovocitos	27
2.7.2. Recuperación del complejo cumulo ovocitos	28
2.7.3. Selección de ovocitos para maduración	30
2.7.4. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos	30
2.7.5. Capacitación de espermatozoides	30
2.7.6. Fecundación <i>in vitro</i>	31
2.7.7. Cultivo de embriones <i>in vitro</i>	31
III. MATERIAL Y MÉTODOS	33
IV. RESULTADOS	38
V. DISCUSIÓN	47
VI. CONCLUSIONES	53
VII. RECOMENDACIONES	54
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	70

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, casa superior de estudios que imparte cultura, ciencia y tecnología.

Al Mg. Fidel Rodolfo Mujica Lengua, por su asesoramiento en la realización de la presente tesis.

Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Estación Experimental Agraria Canaán de Ayacucho, institución que apoyó el presente trabajo de investigación.

A la Dra. Lleretny Rodriguez Alvares y al Dr. Fidel Ovidio Castro, profesores de la Universidad de Concepción de Chile, por su invaluable apoyo.

Al Dr. Teodosio Huanca Mamani investigador agrario del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA-Puno), por su apoyo durante la realización del trabajo de tesis.

RESUMEN

Se realizó el presente trabajo con objetivo de evaluar la bipartición de embriones en diferentes etapas del desarrollo embrionario en *Vicugna pacos* "alpaca". Para comparar si existe o no independencia entre la técnica de bipartición en estadios de mórula y blastocisto, se utilizaron 284 ovarios de alpacas adultas obtenidas del matadero del distrito de Pilpichaca provincia de Huaytará - Huancavelica. Los resultados obtenidos indican que la tasa de regeneración de los embriones divididos sin la utilización de micromanipuladores a las 24 h de cultivo después de la división fue 64,08% en mórulas y 72,08% en blastocistos, existiendo diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los estadios en estudios. Se utilizó el protocolo de Gabor Vaijta modificado para la producción de los embriones y la manipulación, el medio utilizado para la bipartición de los embriones fue TCM-199 Hepes modificado con 30% de SFB, utilizando una microcuchilla para operaciones oculares (Ophthalmic Knife 15°, ANCON®), cultivando los hemi-embryones sin zona pelúcida durante 24 h en Medio SOFaa con SFB y BSA, en bolsas de cultivo con un ambiente de 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂, durante los días de cultivo. Se logró estandarizar la técnica de bipartición de embriones con instrumentos no convencionales obteniendo clones idénticos con bajos costos de producción, se obtuvieron hemi-embryones transferibles por bipartición sin la necesidad de micromanipuladores a partir de mórulas y de blastocistos, demostrándose así que el en estadio de blastocisto, con la técnica de bipartición, se obtiene mejores tasas de regeneración.

Palabras clave: bipartición, hemi-embryones, mórula, blastocisto.

I. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la producción de camélidos sudamericanos cobra gran importancia en el entorno socio-económico en los productores de las regiones alto andinas del Perú, aprovechando de esta manera los subproductos de estas especies como la fibra, carne, pieles y estiércol.

Durante la última década, la investigación y aplicación de nuevas tecnologías relacionadas con la reproducción animal ha evolucionado de manera acelerada, el desarrollo de estas técnicas que incrementan la capacidad reproductiva y permiten el mejoramiento genético de ganado. Las técnicas de manipulación del proceso reproductivo que mayor desarrollo ha tenido son: la superovulación, transferencia de embrionaria, congelación de embriones, cultivo *in vitro* de embriones, partición y clonación de embriones, así como el sexado de embriones y de fetos. La combinación de ellas y su utilización en el ámbito comercial, forma parte de un sistema para la producción y comercialización de mejores animales productores.

Sin duda la aplicación de la biotecnología reproductiva como la bipartición de embriones puede contribuir a superar los bajos índices de fertilidad y aportar al mejoramiento genético en estas especies sobre todo en la multiplicación de

animales de alto valor productivo así convirtiéndose en reproductores para los criadores de camélidos sudamericanos en nuestro país.

Actualmente la bipartición de embriones permite la producción de gemelos idénticos al dividir el embrión original por métodos microquirúrgicos. Las evidencias experimentales indican que existe una relación inversa entre el número de secciones que se le hagan al embrión y el porcentaje de éxito. Las tasas de producción de gemelos monocigóticos van desde poco más de 30% en bovinos y ovinos siendo hasta casi 70% en bovinos, con porcentajes de gestación superiores a 60% e incluso, en algunos casos, equivalentes a 100% .

Establecer la técnica adecuada para la producción de embriones por maduración *in vitro* (MIV), fecundación *in vitro* (FIV) y por consiguiente manipulación de embriones, permitirá al productor alpaquero tener una alternativa en la mejora de su rebaño acortando tiempo y dinero para lograr un rebaño de excelente calidad que le brinde mejores posibilidades de vida.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la bipartición de embriones en diferentes etapas del desarrollo embrionario en *Vicugna pacos* "alpaca"

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar la técnica de la bipartición de embriones con instrumentos artesanales.
- Seleccionar el estadio del desarrollo embrionario más adecuado para poder realizar la bipartición de embriones de alpacas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Los primeros trabajos de investigación en camélidos sudamericanos se iniciaron a partir de la década del 60, como una alternativa tecnológica de respuesta a las necesidades de las grandes haciendas, posteriormente el de las empresas y finalmente al de las comunidades campesinas (Adams y Col., 1989). La utilización de las biotecnologías reproductivas en el Perú es reciente, por lo tanto, debe realizarse mediante el esquema de núcleos de reproductores en áreas geográficas claves de tal manera que sirvan como foco de desarrollo (Alvarado, 2003).

La superovulación y transferencia de embriones son biotecnologías que alcanzaron su máximo desarrollo a comienzos de 1980 y que cuentan con una generación anual de 739 356 embriones, con un total de 520 712 embriones bovinos transferidos en el mundo, estableciéndose un record en el año 1999 (Aba y Col., 1995).

La primera cría de alpaca nacida por transferencia de embriones lo obtuvieron Sumar y Franco en 1974 y posteriormente se comienza a utilizar una técnica no quirúrgica para la recogida de embriones, realizando el lavado del útero a los siete días de la monta, dichos embriones fueron transferidos en fresco permitiendo el nacimiento de una cría (Bourke y Col., 1995).

En un trabajo en el que realizó la recogida de embriones en alpacas, tres días después de la inyección de 1000 UI de hCG (Gonadotropina Coriónica Humana) se recuperaron 31

embriones de un total de 126 ovulaciones, dichos embriones se encontraban en el estadio de dos a ocho blastómeros (Novoa y Franco, 1999).

En llamas se recuperó 37 embriones a partir de 47 hembras no estimuladas (79%) y al ser transferidas a otras hembras receptoras se obtuvo una tasa de concepción del 47% (Taylor y Col., 2000).

Cosio, (2000) evaluó la morfología de los embriones de la alpaca de la raza Huacaya del tercer al décimo día de gestación temprana, utilizando dos grupos: Grupo Control (sin superestimulación) y el Grupo de superestimuladas con eCG; determinando que en el 100% de los casos en hembras control, se encontró un solo embrión; y en hembras estimuladas con eCG, pudo recolectar un promedio de $3,9 \pm 3,17$ embriones.

En un estudio preliminar evaluaron un protocolo de vitrificación de embriones de alpaca sobre la calidad embrionaria de éstos, dos 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 nueve embriones en estadio de blastocisto y clasificados, encontrándose ocho embriones de buena calidad morfológica las cuales fueron transferidos a ocho alpacas receptoras previamente sincronizadas, sin embargo, a la evaluación ecográfica ninguna hembra resulto preñada (Vásquez y Col., 2007).

Realizaron un estudio sobre el efecto del tratamiento de progesterona eCG sobre la calidad embrionaria en llamas, utilizando 30 llamas, las que fueron divididas en dos grupos: Grupo A (sin tratamiento) y Grupo B (tratamiento con eCG), la ovulación fue inducida en ambos grupos mediante monta natural y aplicación de 1 mi de GnRH. En el grupo A se recuperaron cinco embriones (31,25%), mientras que en el grupo B se recuperaron 20 embriones (21,98%). El 60% de los embriones del grupo A fueron clasificados como grado 1, mientras que el 40% de los embriones del grupo B fueron

clasificados con grados dos, tres y cuatro. No se encontraron embriones considerados intransferibles, con lo que se concluyó que el tratamiento hormonal con eCG no afecta la calidad de embriones de llama (Evangelista y Col., 2007).

En un trabajo realizado para determinar el momento óptimo para recuperar embriones del útero de alpaca mediante método no quirúrgico, Cervantes, (2008) determinó que las alpacas superovuladas con eCG están presentes en los cuernos uterinos al día seis post cópula siendo posible su recuperación no quirúrgica a partir de ese día.

El nacimiento de ovejas clonadas por la técnica de bipartición de embriones, histórico logro en Yucatán, la gestación de Terra y Mota, diferente a la de Dolly, este salto cualitativo en el campo de la biotecnología en animales que se realiza en Yucatán fue posible gracias a la participación del grupo de trabajo que encabeza el Dr. Julio Porfirio Ramón Ugalde, especialista en Biotecnología de la Reproducción y profesor-investigador del ITA de Conkal, México

2.2. Aspectos generales sobre la bipartición de embriones

La clonación es la confección de copias idénticas de algún elemento biológico, en animales específicamente, que se refiere a la obtención de seres genéticamente idénticos. Los gemelos homocigóticos en mamíferos, surgen de forma espontánea por la bipartición de un embrión preimplantatorio. Con el deseo de obtener animales genéticamente idénticos para experimentación o la propagación de genotipos de alto valor, se han desarrollado técnicas de micromanipulación de embriones que pueden generar nacimientos de animales viables.

La transferencia de embriones (TE) constituye para la hembra un progreso reproductivo equivalente a la inseminación artificial para el macho, porque permite aumentar el progreso genético a través del incremento de la capacidad reproductiva de la hembra bovina. El desarrollo biotecnológico posterior, a partir de la manipulación de los embriones

recolectados, convirtió a esta técnica en una valiosa herramienta para la producción de una cantidad supernumeraria de embriones y su retorno al ambiente uterino. A partir de la década de 1980 se inició en Cambridge (Willadsen, 1989) una nueva fase con el desarrollo de la microcirugía de embriones (MC) con la producción de mellizos idénticos. Esta comprende la micromanipulación de embriones en estadio de mórula o blastocisto, obtenidos por lavajes no quirúrgicos, con la división en dos partes iguales (hemiembriones). Sus particularidades la convierten en una técnica interesante no solamente por aumentar la eficiencia reproductiva de un individuo o factor determinado (por ejemplo, ausencia de cuernos en la raza Fleckvieh), sino también por permitir la disponibilidad de animales idénticos en un programa de TE así como también para ser empleados como modelo de investigación (Brem, 1986). Esta técnica fue rápidamente adoptada y es aplicada actualmente en los programas convencionales de TE en países con alta disponibilidad tecnológica (Gray y Col., 1991; Kippax y Col., 1991 y Lange y Col., 1991). Existe sin embargo escasa información sobre la aplicabilidad de esta técnica en países de bajas condiciones extensivas de producción y con el empleo de receptoras de razas productoras de carne o sus cruzas, cuya rusticidad las hace más adecuadas a esos sistemas de producción que las razas lecheras, pero cuya capacidad de gestar y criar dos individuos constituye interrogantes.

2.3. Técnicas de clonación de embriones

Con base en los conceptos de la clonación descritos anteriormente, se observa que existen tres técnicas que han sido utilizadas en animales de granja o de laboratorio para producir embriones genéticamente idénticos. Dos de ellas cabrían en el concepto de la clonación en un sentido horizontal: la partición o división de embriones por microcirugía, y la separación y cultivo de blastómeros aislados por métodos enzimáticos o mecánicos (Agca y Col., 1998 y Rexroad y Powell, 1997). La tercera entra en el concepto de la clonación en un sentido vertical: la transferencia nuclear a partir de células somáticas de

adulto o embrionarias (Campbell y Col., 1996) o de blastómeros de embriones (Prather y Col., 1987; Lavoit y Col., 1997; Tanaka y Kanagawa, 1997) entre otras células (Tabla 1).

Tabla 1. Principales tipos celulares utilizados en las técnicas de clonación

Metodología	Tipos Celulares
A) Partición de embriones	Mórulas o blastocistos tempranos o tardíos.
B) Separación y cultivo de blastómeros aislados	Blastómeros de embriones en diferentes etapas de la segmentación, desde 2 células hasta mórulas, cultivándose <i>in vitro</i> dentro o fuera de su zona pelúcida. Partenogenotes (ovocitos activados químicamente para dividirse) para reagregar blastómeros.
C) Transferencia nuclear	
Como carioplastos (células donadoras de núcleos)	Blastómeros obtenidos de embriones en diferentes etapas de la segmentación (desde 2 células hasta blastocistos). Células somáticas de embriones (trofoectodermo y masa celular interna o MCI, fibroblastos fetales, células de riñón, piel, músculo, glándula mamaria y células cúmulo o espermatogonias de animales adultos).
Como citoplastos (células receptoras de núcleos)	Ovocitos enucleados Cigotos Embriones de 2 blastómeros.

Fuente: Navarro y Col., 2003.

2.3.1. Bipartición o división de embriones

En la década de los 70 se pensaba que los embriones en fases tempranas de la segmentación no sobrevivirían después de una microcirugía. Fue en los años ochenta cuando se demostró que las mórulas y blastocistos de los animales domésticos eran capaces de desarrollarse después de una partición y producir nacimientos viables (Rorie y Godke, 1987). Actualmente la partición de embriones permite la producción de gemelos idénticos al dividir el embrión original por métodos microquirúrgicos. Las evidencias experimentales indican que existe una relación inversa entre el número de secciones que se le hagan al embrión y el porcentaje de éxito. Las tasas de producción de gemelos

monocigóticos van desde poco más de 30% en bovinos y ovinos (Edwards y Beard, 1998; Heyman y Col., 1998 y Williams y Col., 1984) siendo hasta casi 70% en bovinos, con porcentajes de gestación superiores a 60% (Rorie y Godke, 1987) e incluso, en algunos casos, equivalentes a 100% (Williams y Col., 1983).

El número de células que tenga el embrión no solo limita el número de segmentos en que pueda dividirse, sino que también tiene incidencia sobre otros aspectos. Típicamente se utilizan embriones en etapa de mórula o blastocisto (Baker, 1985). Esta estrategia permite utilizar una de las secciones para otros fines experimentales como la determinación del sexo del embrión, mientras que el resto se cultiva o congela para después transferirse a hembras receptoras previamente sincronizadas para mantener la gestación (King y Col., 1992, Schmidt y Col., 1992 y Palma y Col., 1995). Los embriones en etapa de blastocisto son seccionados de manera que se dividan en dos partes iguales tanto la masa celular interna (MCI) como el trofoectodermo. Es recomendable emplear soluciones que deshidraten ligeramente al embrión (por ejemplo, sacarosa 200 mM), con lo que se reduce el daño al trofoectodermo durante su partición. Una vez cortadas, las mórulas compactas y los blastocistos no necesariamente deben ser introducidos a zonas pelúcidas, teniendo una sobrevivencia aceptable al ser transferidas en hembras receptoras; aunque existen informes que indican tasas de supervivencia de 15% en medios embriones (o demi-embryones) sin zona pelúcida y de 35% cuando se transfieren con zona pelúcida. En este último caso las tasas de gestación van de 55% a 65% en bovinos (Baker, 1985; Willadsen y Godke, 1984) obtuvieron tasas de gestación de 80% en bisecciones de embriones de ovino indistintamente si tenían zona pelúcida o no. En la Tabla 2 se muestran algunos de los factores principales que afectan las tasas de éxito con esta técnica.

Tabla 2. Factores y consideraciones de la bipartición de embriones

Factores	Consideraciones
Calidad morfológica	Mejores los de grados 1 a 2.
Fase de segmentación de los embriones	Mejores resultados y con mayor tasa de gestación en blastocistos que con mórulas
Número de secciones en las que se divide al embrión	Los medios embriones (demi-embryones) sobreviven mejor en el útero que los cuartos embriones. Los cuartos embriones carecen de MCI funcional, viabilidad reducida.
Presencia de zona pelúcida	Resultados controversiales, necesaria en algunos casos o con escasa diferencia.
Sistema de cultivo de los embriones partidos	Mejor en oviductos ligados que <i>in vitro</i> .
Número de hemi-embryones transferidos a hembras receptoras	Relación directa entre el número de hemi-embryones transferidos y la tasa de gestación.
Preservación	Menor probabilidad de supervivencia de demi-embryones congelados.
Sexo	Afectado por la manipulación y el cultivo de los embriones, mayor pérdida de embriones femeninos.

Fuente: Navarro y Col., 2003.

2.3.2. Separación y cultivo de blastómeros aislados

En algunas especies, como los equinos, se ha utilizado la separación de blastómeros de embriones previos a su implantación para efectuar estudios de diagnóstico de enfermedades genéticas. En ellos se ha determinado la viabilidad de los embriones analizados después de su transferencia en hembras receptoras, encontrándose 21% de tasas de gestación (Huhtinen y Col., 1997).

En humanos, la separación y cultivo de blastómeros aislados también han sido utilizados en estudios de biopsias de embriones en diferentes etapas de segmentación con la finalidad de dar alternativas a los estudios de diagnóstico prenatal, evaluando a su vez el desarrollo embrionario *in vitro* con el propósito de que se seleccionen los mejores embriones capaces de desarrollarse en blastocistos y congelarlos mientras se evalúan

sus blastómeros aislados (Geber y Col., 1995; Pierce y Col., 1997; Geber y Sampaio, 1991).

La técnica de separación de los blastómeros implica la remoción de la zona pelúcida, ya sea por métodos químicos, mecánicos o enzimáticos, para posteriormente obtener los blastómeros mediante aspiración, extrusión o disminución de sus interacciones en soluciones libres de Ca^{2+} y Mg^{2+} (Lavoit y Col., 1997; Saito y Niemann, 1991; Cheong y Col., 1993 y Reichelt y Niemann, 1994). Los blastómeros de rata aislados en la etapa de dos células, son capaces de formar embriones completos (Matsumoto y Col., 1989). En el ratón se han obtenido gemelos idénticos removiendo la zona pelúcida de embriones de dos células y cultivándolos separadamente previo a su transferencia (Williams y Col., 1984). En otras especies, el éxito del experimento se ha determinado como dependiente de diversos factores. Así, por ejemplo, en porcinos y ovinos la baja eficiencia en la obtención de fetos se debe a la baja sobrevivencia *in vivo* de embriones libres de zona pelúcida en fases previas a la compactación (Williams y Col., 1984). Esta tasa de nacimientos puede aumentarse si se utilizan embriones encapsulados en gel de agarosa (Heyman y Col., 1998, Lehn-Jensen y Willadsen, 1983). De manera que algunas estrategias para suplir a la zona pelúcida son el empleo de cápsulas artificiales de agarosa (Willadsen, 1979) o de alginato de sodio (Eaton y Col., 1990 y Adaniya y Col., 1993), o matrices extracelulares como la fibronectina y laminina (Saito y Niemann, 1991; Wilton y Trounson, 1989).

El número de células que forman al embrión separado constituye otro factor importante en la probabilidad de éxito. Willadsen, (1989) demostró que la tasa de gestación en ovinos y bovinos se reducía conforme se hacían grupos de células de números menores. La mayor tasa de gestación que obtuvo este autor fue del 66% al utilizar embriones de dos células o dos grupos de células provenientes de embriones de hasta ocho células. Cuando utilizó embriones de cuatro células o pares de células de embriones de ocho células, la tasa de

gestación se redujo a 50%. Cuando se utilizaron los blastómeros individuales provenientes de embriones de ocho células, la tasa de gestación fue de sólo 5%. En todos los casos en los que se separaron las células embrionarias, el número de células formando el blastocisto se reducía linealmente con el número de "divisiones" a la que era sometido el embrión. Un dato importante de este estudio es que cuando se utilizaron las células individuales de los embriones de ocho células, el desarrollo de la MCI se veía fuertemente comprometido al extremo de formarse sólo vesículas sin la presencia de este grupo de células. Aparentemente, en los blastómeros aislados se promueve más fácilmente la apoptosis y se afecta preferentemente a las células de la MCI. Este proceso contribuye a la incidencia de abortos debido a que la poca cantidad de células de la MCI reduce la viabilidad fetal (Chan y Col., 2000). En monos, ésta misma técnica ha sido aplicada a partir de embriones de ocho células, en la que se separan los blastómeros mientras son mantenidos en medio libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} , y luego se reagrupan por pares que se introducen en zonas pelúcidas para que puedan desarrollarse hasta la fase de compactación y así transferirlos a hembras receptoras. El 8% de los embriones tratados brindaron crías vivas (Chan y Col., 2000).

2.3.3. Transferencia nuclear

Una técnica que incrementa el potencial de desarrollo de los blastómeros aislados de embriones de ocho células de etapas más tardías de la segmentación es la transferencia nuclear (Willadsen, 1989). Esta técnica permite la producción de individuos genéticamente idénticos originados a partir de un solo donador de núcleos (Romo, 1994). Implica la inserción por métodos químicos, físicos, biológicos o mecánicos del núcleo de una célula donadora que puede ser tomada de varios tejidos a la cual se le llama carioplasto, con un ovocito activado y carente de núcleo, o con un huevo fertilizado al que se le hayan extraído los pronúcleos (Edwards y Beard, 1998; Willadsen, 1989; Meng y Col., 1997 y Bromhall, 1975).

Contrariamente a lo que pudiera pensarse, el desarrollo de esta metodología es más bien antiguo, si bien hasta hace poco ha acaparado el interés no sólo de la comunidad científica, sino del público en general. En la Tabla 3 se muestra una cronología de los eventos más importantes en la obtención de organismos clonados por transferencia nuclear.

Tabla 3. Eventos de la clonación mediante transferencia nuclear y separación de blastómeros.

Año	Evento
1938 Hans Spemann	Divide un cigoto de salamandra con un cabello; mantiene al núcleo en una de sus mitades que continúa su segmentación. Al retirar la barrera, uno de los nuevos núcleos llega al interior de la mitad que carecía de él y se segmenta hasta convertirse en otro embrión.
1952 Robert Briggs y Thomas King	Demuestran que los núcleos de blastocistos de rana (<i>Rana pipiens</i>) son capaces de desarrollar renacuajos al ser transferidos a ovocitos enucleados.
1967 Di Bernardino	Observa que los núcleos aislados de embriones de rana en etapa de gástrula, desarrollan renacuajos anormales.
1981	Primer reporte del nacimiento de ratones provenientes de la transferencia de núcleos de células somáticas en ovocitos enucleados, al intentar repetir estos experimentos otros investigadores no pudieron lograrlo.
1984	Clonación de ovinos utilizando núcleos de blastómeros de embriones por fusión con virus Sendai o campo eléctrico con ovocitos enucleados. Ovejas a término de su desarrollo.
1987	Nacimiento de dos terneros a partir de cigotos reconstituidos con núcleos de blastómeros de embriones electrofusionados con ovocitos enucleados. Cultivo in vivo en oviductos de oveja hasta blastocisto y transferencia a una vaca receptor a hasta que llegaron al término de su desarrollo.
1992	Uso del color ante Hoechst para monitorear el proceso de enucleación de ovocitos de bovino. Nacimiento de 32 terneros.
1993	Electrofusión de núcleos de ratón a partir de blastómeros de embriones en estado de 2, 4 y 8 células con ovocitos, con nacimiento de crías vivas.
1996	Nacimiento de ovejas vivas partiendo de ovocitos enucleados por transferencia núcleos de células epiteliales de embriones de 9 días de gestación mantenidas en etapa G ₀ .
1997	Nacimiento de "Dolly" utilizando el núcleo de células derivadas de glándula mamaria de oveja adulta arrestada en la fase G por reducción de suero en el medio. Los núcleos fueron electrofusionados a ovocitos enucleados. La tasa de éxito es inferior al 1%.

1997	Nacimiento de "Neti" y "Ditto", dos monos Rhesus obtenidos por electrofusión de núcleos derivados de fertilización <i>in vitro</i> y ovocitos madurados <i>in vitro</i> , enucleados y activados con cicloheximida. Tasa de éxito de 3.77%.
2000	Obtención de cerdos clonados mediante electrofusión y microinyección de núcleos. Tasas de éxito inferiores al 8%.

Fuente: Navarro y Col., 2003.

Es importante destacar que tanto el citoplasma que recibirá al núcleo transferido como el propio núcleo deben tener características fisiológicas específicas para que se realice con éxito tanto la transferencia nuclear como el desarrollo posterior de la célula reconstituida y, eventualmente, el desarrollo del nuevo organismo. La célula que contiene al núcleo que será transferido (carioplasto) debe tener características particulares que permitan cierto porcentaje de éxito antes de ser colocado en el espacio perivitelino adyacente a la membrana del ovocito (citoplasto) y se fusione. Experimentalmente el uso de citocalacina B para bloquear la polimerización de microfilamentos, y de colchicina para la de los microtúbulos, permiten controlar los movimientos del citoesqueleto en el carioplasto, provocar una elasticidad de la membrana plasmática y favorecer así la enucleación mediante el uso de micropipetas, sin romper la membrana plasmática (Edwards y Beard, 1998; Prather y Col., 1987; Cheong y Col., 1993; McGrath y Solter, 1996; Prather y Col., 1990; Yong y Yuqiang, 1998).

Si se utiliza un embrión en segmentación como carioplasto, también requerirá de la micromanipulación para obtener sus blastómeros. Uno de estos últimos se transfiere dentro del ovocito en metafase II desprovisto previamente de su núcleo, y se fusiona con él. Mediante este proceso, el ovocito se activa y da inicio a su desarrollo como un nuevo embrión. En algunas especies la sola transferencia del carioplasto inicia la activación del ovocito (Edwards y Beard, 1998; Prather. y Frist, 1990; Bromhall, 1975 y McLaren, 1984). La primera etapa de esta metodología es la obtención del citoplasma adecuado para que sirva de aceptor del núcleo. A los ovocitos en metafase II se les retira el núcleo o, en el

caso de huevos fertilizados, se les extraen los pronúcleos en microscopía de contraste de fases. Para confirmar que el material cromosómico haya sido totalmente extraído, se aplican tinciones de ADN en el citoplasma del ovocito. El colorante más utilizado para esta etapa es el Hoechst 33258 para visualizar la ausencia de contenido nuclear en los ovocitos enucleados, bajo luz ultravioleta durante períodos de menos de diez segundos, sin efectos negativos en el desarrollo de los embriones reconstituidos (Yong y Yuqiang, 1998; Stice y Keefer, 1993 y Le Bourhis y Col., 1998).

Respecto a las características del carioplasto, entre más diferenciada esté la célula somática, menor será la probabilidad de éxito en la transferencia nuclear. Para que una célula sea totipotencial requiere que su núcleo sea capaz de desarrollarse en un nuevo embrión (Solter, 1996). Para ello los genes que dan lugar al desarrollo de un organismo completo deben estar presentes aun cuando no todos sean expresados (Casas y Betancourt, 1998). Algunos de los genes que deben expresar las células totipotentes son el gen Tnap, los factores de transcripción, los genes Oct 3/4, el proto-oncogen ckit, y la ADN metiltransferasa Mt (Urven y Col., 1993).

La experiencia con múltiples tipos celulares tanto embrionarios como de tejidos diferenciados ha demostrado que el uso de núcleos de blastómeros obtenidos de embriones de dos células es más eficiente que los de ocho células; asimismo, los núcleos de blastómeros o de las células de la MCI son más eficientes que los de las células de la granulosa, por ende, las células embrionarias son más efectivas que las células de individuos adultos (Edwards y Reard, 1998). A su vez, los núcleos de las células de la MCI son más efectivos que los de las células del trofoectodermo (McLaren, 1984). Cheong y Col., (1993) encontraron que al utilizar núcleos de blastómeros de embriones de dos, cuatro y ocho células que se hallaran en la fase temprana del ciclo celular (fase G 1 de la segunda división), como donadores de núcleos para ser transferidos, los de dos células daban 78% de blastocistos y 29% de ratones nacidos vivos a partir de los

embriones reconstituidos, mientras que los de cuatro células daban 71% de blastocistos y 22% de ratones nacidos vivos, y los de ocho células daban 46% y 17% respectivamente. En resumen, los núcleos obtenidos de embriones en las fases tempranas de la segmentación tienen la ventaja sobre los provenientes de células diferenciadas en que los primeros reversion con facilidad los cambios que sufren previo a su diferenciación; mientras que los últimos deben revertir los cambios que ya han sufrido durante más de 30 ciclos de divisiones celulares.

Es por ello que una transferencia nuclear eficiente, con un desarrollo a término del huevo manipulado, dependerá de la reprogramación adecuada del núcleo donador. Las macromoléculas del tipo del ARN mensajero y las proteínas almacenadas en el ovocito sólo soportan el desarrollo embrionario durante un tiempo relativamente corto. Entre más corto sea este período, se requerirá menor tiempo para la reprogramación. Conforme el embrión sufre cambios mayores y crece, sus células requerirán mayor tiempo y será probable que esta reprogramación no se lleve a cabo adecuadamente. En algunas especies, la activación de la transcripción del genoma reintroducido ocurre hasta el estado previo al blastocisto, por lo que depende de la transcripción del ARN materno. En embriones productos de una fertilización normal, este proceso se lleva a cabo a diferentes tiempos en diferentes especies: a partir del estado de dos células en ratones y caprinos; de cuatro células en porcinos; y en el paso de ocho a dieciséis células en embriones de ovinos y bovinos (Prather y Col., 1987). En la transferencia nuclear, la compatibilidad entre el citoplasma recipiente y el núcleo donador, es poco entendida aún y toma parte en la reprogramación del núcleo donado (Solter, 1996).

Dentro de los cambios que deben revertir los núcleos de las células de adulto durante la transferencia nuclear está la metilación del ADN que es esencial para el desarrollo embrionario. El genoma del ovocito está poco metilado, mientras que en el embrión comienza a incrementarse esta metilación. Este último afecta la expresión de los genes, la

inactivación del cromosoma X, la diferenciación celular, y el imprinting (Kokalj-Vokoc y Col., 1998). Otros cambios asociados son la activación de las histonas y modificaciones en otras proteínas nucleares. Si estos cambios no se revierten, durante el crecimiento ocurrirían modificaciones genéticas de los núcleos adultos, tales como la mutagénesis somática, los errores mitóticos, las deleciones y trisomías (Edwards y Beard, 1998).

Con el propósito de revertir los cambios en las células diferenciadas y así incrementar las tasas de éxito en la fusión y en el desarrollo de embriones reconstituidos por medio de la transferencia nuclear, es importante la sincronización de los ciclos celulares de las células donadoras de núcleos y de los ovocitos receptores (Meng y Col., 1997; Solter, 1996; Serrano y Garcia-Suárez, 1997 y Merchant, 1997), le llama a este proceso sincronización nucleocitoplásmica.

Como es ampliamente conocido, durante la vida fetal y hasta la pubertad, el ovocito de los mamíferos se encuentra detenido en la etapa de diploteno de la profase de la meiosis I y sus cromosomas se condensan poco antes de que ocurra la ovulación por acción de las gonadotropinas. Este estímulo promueve que el ovocito reasuma su programa de división formándose el ovocito secundario con su primer cuerpo polar, eliminando así la mitad de su material genético. En los mamíferos adultos, el crecimiento del ovocito es continuo y termina en la ovulación, cuando es depositado en el oviducto en donde madura e inicia su segunda división meiótica (meiosis II), en la cual se vuelve a detener, solo que esta vez lo hace en la metafase II. El ovocito arrestado en metafase II continuará su división únicamente si es activado por el espermatozoide durante la fertilización, en cuyo caso culminará su segunda división meiótica y formará el segundo cuerpo polar (Merchant, 1997; Loi y Col., 1998 y Wassarman, 1999).

Durante la maduración y la activación, el citoplasma del ovocito modifica sus propiedades en la medida en que la célula es liberada del arresto en la metafase II y es activada con la fertilización mediante una serie de descargas de calcio que promueven la reacción

cortical. Una vez ocurrida la fertilización, la transcripción del ARN materno comienza a controlar el desarrollo en las primeras divisiones mitóticas hasta la activación del genoma embrionario. Cuando se efectúa una transferencia nuclear, la transcripción del genoma materno del ovocito dirige al núcleo donado mientras que éste es capaz de asumir el control de las fases embrionarias tempranas por sí mismo (Edwards y Beard, 1998).

Al igual que en las células que se dividen, el ciclo celular del ovocito se encuentra controlado mediante dos factores proteínicos: el factor promotor de la mitosis de la maduración (MPF) formado por una ciclina y la cinasa dependiente de ciclina, y el factor citostático (CSF) que es esencialmente el mismo MPF pero asociado a una proteína que inhibe la acción de la cinasa. Cuando la proteína inhibidora de la ciclina se degrada, la célula es capaz de sintetizar ADN, si el inhibidor no se degrada, la célula primeramente es incapaz de entrar a la fase S del ciclo y, en consecuencia, puede condensar de manera prematura su material genético. Cuando las concentraciones del MPF se elevan, se inducen algunas alteraciones, tales como la desintegración o rompimiento de la envoltura nuclear (DEN), la condensación prematura de los cromosomas (CPC) y la reorganización del citoesqueleto (Campbell y Col., 1996 y Meng y Col., 1997).

Para que los eventos ocurran apropiadamente después de la transferencia nuclear, los niveles de MPF deben descender o ser bajos. De otro modo la incidencia de daño cromosómico y aneuploidías puede ser alta (Meng y Col., 1997 y Yong y Yuqiang, 1998). Si la transferencia nuclear se hace cuando el ovocito tiene bajos niveles de MPF (siete a diez horas después de su activación), no sólo se presentarán menos problemas de aneuploidías, sino que además se mantendrá intacta la envoltura nuclear y los cromosomas no se condensarán prematuramente, por lo que continuarán su ciclo de replicación-condensación de manera normal, favoreciendo la sincronización nucleocitoplásmica y con ello el desarrollo del cigoto así reconstituido (Merchant, 1997).

Si se fusionan células en G con células en G, el material genético de estas últimas sufre una condensación prematura como si estuviera lista a iniciar los movimientos clásicos de la división celular (mitosis). Si la fusión es entre células en etapa S y G, la síntesis del material genético se completa y el contenido de cromosomas en el producto es Aberrante, pues no sólo hay más sino que incluso las células hijas sufren la falta de uno varios de ellos, mientras que la otra presenta más de un par de copias de un cromosoma (trisomías)

Los núcleos donadores que se encuentren en la fase del ciclo G o G resultan en un mejor desarrollo 1 o J que los que están en fases S y G₀, ya que es más sencillo reprogramar un genoma que está abierto para sufrir una replicación, además de que los factores citoplásmicos tienen mayor acceso al genoma cuando las células donadoras están en dichas fases (Wilmot y Col., 1997). Los núcleos se inducen a entrar en un estado de quiescencia (G) cultivando las células donadoras o en medios con cantidades reducidas de suero. De esta manera se coordinan los ciclos celulares del carioplasto y citoplasto.

Ahora bien, para la fusión de carioplastos y citoplastos se han utilizado estímulos eléctricos, virales y químicos. La fusión eléctrica y la fusión viral se han utilizado en roedores, lepóridos y ovinos. La fusión eléctrica se ha usado además en bovinos y en monos *rhesus* (Meng y Col., 1997 y Prather y Col., 1990). La fusión inducida por el virus Sendai tiene el inconveniente de que los núcleos transferidos no sobreviven o los embriones reconstituidos no logran segmentarse. Las tasas de éxito en la fusión por virus son de 30% en ovinos, siendo de tan solo 8% en bovinos (Prather y Col., 1990 y Bromhall, 1975), por lo que este tipo de estímulo ya no se utiliza. Una vez efectuada la fusión, los factores presentes en el citoplasma del ovocito enucleado y activado serán los que reprogramen al núcleo, confiriéndole la habilidad para regular el desarrollo embrionario hasta que llegue a término (Edwards y Beard, 1998 y McLaren, 1984). Este desarrollo embrionario puede llevarse a cabo *in vitro*, o *in vivo* en oviductos de ovino (Willadsen, 1989 y Prather y Col., 1990).

Todavía existe gran variabilidad de resultados con estas técnicas, con tasas de éxito en la electrofusión de blastómeros obtenidos a partir de embriones de ocho células del 90% en ovinos, 74% en bovinos, 84% en lepóridos y 87% en porcinos (Prather y Col., 1990), y tasas de gestación de 0% a 54% (Romo, 1994) o hasta de 78% en bovinos. En esta última especie, las tasas de segmentación de los embriones reconstituidos varían según el sexo de los mismos: 73% para embriones hembras, 63% para embriones machos (Le Bourhis y Col., 1998).

Existe un informe interesante en bovinos que describe la transferencia nuclear utilizando ovocitos de vacas Holstein (*Bos taurus*) con núcleos de células aisladas de embriones Brangus (5/8 Angus, *Bos taurus* y 3/8 Brahman, *Bos indicus*).

En otra etapa del estudio, utilizaron blastómeros de embriones de ocho a dieciséis células de ovino que se fusionaron con ovocitos enucleados de caprino, desarrollándose hasta el estado de ocho células al ser cultivados *in vivo* en oviducto de ovino. Lo anterior demuestra que es factible obtener un clon a partir de dos células provenientes de diferentes especies animales y cultivarlo *in vivo* en el aparato reproductor de una especie no homóloga (Willadsen, 1989).

2.4. Ventajas y desventajas de las técnicas de clonación

La clonación a partir de células de animales adultos tiene algunas ventajas y desventajas dependiendo de la técnica que se trate (Tabla 4), aunque en general todas tendrían la ventaja de que al conocerse las características del donador permitirían seleccionar a los individuos con alto valor biológico o productivo si las características seleccionadas dependen solo de factores genéticos, lo que no es tan probable por el efecto de las condiciones ambientales, de manera que se desconoce hasta qué grado es un clon realmente idéntico a su donador (Lisker y Tapia, 1997).

Tabla 4. Comparación entre la clonación por separación de blastómeros y la transferencia nuclear

Separación de blastómeros	Transferencia nuclear
Ventajas	
Obtención de individuos 100% idénticos genéticamente entre sí.	Obtención de copias genómicas de individuos superiores
Facilidad de obtención de blastómeros aislados	
No requiere métodos especializados para obtener los carioplastos, citoplastos o la fusión entre ellos.	
En la separación y regeneración de blastómeros los blastocistos obtenidos de quintuples y séptuples pueden utilizarse para establecer células totipotenciales.	
Desventajas	
Necesita determinarse el medio óptimo para el desarrollo embrionario <i>in vitro</i> para cada especie utilizada.	Los clones no son 100% idénticos genéticamente debido a la participación del ADN mitocondrial
Puede requerir de la utilización de zonas pelúcidas o de sustitutos de ellas.	Los clones muestran diversos grados de alteración.
Bajas tasas de éxito en crías nacidas que se reducen al utilizar embriones en fases avanzadas de la segmentación.	Requiere de metodologías y equipos sofisticados para la obtención de carioplastos, citoplastos y su fusión.
Tasas de aborto elevadas después de transferir embriones clonados en hembras receptoras	Requiere de una adecuada sincronización nucleocitoplásmica
	Bajas tasas de éxito en crías nacidas.

Fuente: Navarro y Col., 2003.

Una de las consideraciones que deben hacerse cuando se planea la clonación por transferencia de núcleos tornados de células de adultos, es que éstos reflejan la edad biológica del donador. Esto último parece ser trivial, sin embargo tiene importancia si se analiza lo ocurrido con las regiones terminales de los cromosomas. En estas regiones se encuentra ADN de secuencia altamente repetida y en forma general, por tripletes o tétradas de nucleótidos repetidos, dichas secuencias se conocen como microsatélites. Experimentalmente se ha determinado que el número de repeticiones que debe tener es

importante para la función celular. Durante el envejecimiento, cada vez que la célula se divide el número de estas repeticiones se hacen menores y permiten que se desarrollen enfermedades propias de la edad adulta aún en organismos "jóvenes" (Marshall, 2000).

Sin embargo, Lanza y Col., (2000) observaron que en bovinos clonados por transferencia nuclear a partir de células somáticas envejecidas *in vitro*, ocurría un aumento en la duración de la vida replicativa de la célula así como en la longitud de sus telómeros. Asimismo, las células somáticas que han estado expuestas a carcinógenos químicos y radiaciones durante períodos prolongados, en este sentido, es posible que hayan acumulado mutaciones que pueden manifestarse durante la gestación, como malformaciones congénitas o predisposiciones a diversas enfermedades en los recién nacidos (Lisker y Tapia, 1997).

Con la clonación queda todavía un buen número de problemas a resolver, como son la eficiencia de la técnica de transferencia nuclear, que actualmente es muy baja y demasiado costosa para aplicarla comercialmente de manera rutinaria, ya que aún en el estudio más conocido de esta técnica se obtuvo una eficiencia de 0,36% (Wilmut y Col., 1997). Considerando que el patrón de desarrollo de los cigotos es muy diverso, la adaptación de las técnicas a otras especies precisa aún de una extensa investigación para cada una de ellas (Merchant, 1997).

2.5. Aplicaciones de la clonación de embriones

En el ámbito científico, la clonación ha abierto un nuevo campo de experimentación para abordar problemas fundamentales sobre los mecanismos que controlan la diferenciación celular en el inicio del desarrollo (Merchant, 1997). También es útil en los estudios de fisiología, embriología, genética y crianza animal (Heyman y Col., 1998 y Williams y Col., 1984). Los individuos genéticamente idénticos pueden ser de sumo valor para los experimentos controlados en los que se evalúen los efectos ambientales, tales como nutrición, instalaciones y medicamentos. La transferencia de genomas idénticos en

diferentes tipos de citoplastos permitiría evaluar las interacciones entre citoplasma y núcleo (Williams y Col., 1983).

Los clones transgénicos y los derivados de células primordiales pueden ser incluidos en la investigación de terapias celulares o néticas, principalmente si se trabaja con primates no humanos, ya que esto último salvaría la distancia existente entre las especies de roedores comúnmente utilizadas en los laboratorios para desarrollo y prueba de fármacos de uso en humanos. En enero de 2001, el grupo de Gerald Schatten dio a conocer el nacimiento de un simio que tiene insertado el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), de tal suerte que sus células pueden ser utilizadas con relativa facilidad para estudios encaminados a determinar los efectos nocivos de fármacos que puedan ser semejantes a los obtenidos en humanos, los estudios de fases terminales pueden ser más rápidos y con un modelo más cercano evolutivamente, en lugar del riesgo que implica hacer la extrapolación del modelo de roedor o conejo, comúnmente usado en la investigación farmacológica.

Asimismo, los clones con fechas distintas de nacimiento (considerando que de un mismo grupo de clones unos sean transferidos directamente y otros sean congelados para transferirlos con posterioridad) tienen aplicación en el análisis fenotípico de los individuos clonados antes de que sean propagados y en la transferencia seriada de células totipotentes para dirigir la edad celular más allá de las expectativas de vida (McLaren, 1984). Además, los clones implantados en una misma hembra subrogada podrían probar los efectos epigenéticos que incluyan el ambiente materno (Chan y Col., 2000).

2.5.1. Clonación de embriones por generación múltiple

La última meta de los proyectos de clonación de embriones es producir gran número ilimitado de individuos idénticos a partir de un individuo original. Lo anterior ha sido llevado a cabo a través de la clonación por generación múltiple también conocido como re-clonación, que utiliza embriones clonados por transferencia nuclear como donadores

de núcleos para producir la próxima generación de embriones idénticos. De manera que si el primer ciclo de transferencia nuclear produce 10 embriones clonados viables, el siguiente ciclo posiblemente resultaría en 100 embriones clonados en la segunda generación (Singla y Col., 1997 y Stice y Keefer, 1993).

A este respecto, desde la década de los 80, se han reportado resultados exitosos en los procedimientos de re-clonación, pudiéndose obtener seis generaciones de embriones (Willadsen, 1989) y terneros de tercera generación a partir de embriones en diferentes estados de segmentación, obtenidos por transferencia nuclear.

Asimismo, la multiplicación en serie de embriones mediante la clonación ha incrementado el número de prole producida de un embrión donador determinado. Mediante ciclos repetidos de transferencia nuclear, se han obtenido gestaciones de clones de tercera generación y se han producido embriones en etapa de blastocisto de clones de quinta generación. Los límites de la clonación en serie aún no han sido definidos. Las tasas de gestación de los embriones en estado de mórula o blastocisto producidos por clonación en serie no difieren de las tasas de gestación de los clones derivados de embriones frescos (Singla y Col., 1996 y Stice y Keefer, 1993).

Se ha visto que los blastómeros provenientes de embriones clonados por transferencia nuclear en etapas más tempranas de la segmentación, tienen mayores probabilidades de fusionarse a los citoplastos que los provenientes de embriones clonados en etapas más tardías de la segmentación, y que esto va relacionado con el tamaño del blastómero que se va a transferir. Las tasas de éxito en la re-clonación difieren con relación en el tiempo de cultivo y el número generacional del clon; por ejemplo, cuatro días de cultivo *in vivo* en oviductos de ovino da lugar a tasas de fusión de 68% en embriones reconstituidos de bovino, respecto del 57% obtenidos tras cinco días de cultivo *in vivo*. Sin embargo, los clones de cinco días de cultivo pueden producir 4,5 generaciones de clones, mientras que los de cuatro días solo 3,6. La tasa de éxito en la fusión se reduce de una generación a

otra, ya que de una línea clonada se han obtenido 11 clones en la primera generación, 16 en la segunda, 20 en la tercera y solo siete clones en la cuarta generación (Stice y Keefer, 1993).

Yong y Yuqiang, (1998) lograron obtener crías de caprino de la primera a la sexta generaciones, de las cuales tres pares fueron gemelos monocigóticos, tres series fueron de triples monocigóticos, dos series de cuádruples monocigóticos, tres series de quintuples y una serie de heptuples monocigóticos.

Los abortos y las tasas de gestación pueden diferir entre reclines y la primera generación de embriones clonados por transferencia nuclear. Willadsen, (1989) informa que la segunda o posteriores generaciones de bovinos y ovinos, tienen tasas de gestación más bajas que la primera generación de embriones clonados, y que las tasas de aborto se incrementan a partir de la segunda generación.

Con el estudio profundo y el adecuado control de las deficiencias actuales de la clonación, en un futuro la clonación en serie permitirá a su vez, la clonación de animales transgénicos que contengan genes selectos. De ahí se deduce que la clonación ofrece una enorme oportunidad para la ganancia genética, el incremento en la eficiencia de la producción de alimentos de origen animal y los programas de investigación (Singla y Col., 1997).

3.5.2. Aspectos comerciales de la clonación de embriones

Cuando la clonación se aplica a los embriones de alto valor, la habilidad para producir varios nacimientos por cada embrión ofrece suficiente ventaja económica para recuperar los costos involucrados, sobre todo si se utilizan procedimientos de sexado de embriones, de manera que los nacimientos de individuos clonados sean de sexo predeterminado. Esto pondría un límite en el número de embriones de sexo masculino transferidos, lo cual reduciría el número de transferencias requeridas o permitiría obtener una población de pie de cría efectiva con el mismo número total de transferencias (Nicholas, 1983). Sin

embargo, la eficiencia con la que se cuenta actualmente aún no permite una producción de embriones en masa a un costo accesible para la producción de animales comerciales (Singla y Col., 1997). Es necesario que se incrementen significativamente las tasas de éxito para que el mercado de los embriones clonados pueda hacerse realidad.

Actualmente en el mundo existe un laboratorio que ofrece la clonación de embriones por transferencia nuclear, a la cual los ganaderos pueden enviar sus embriones para recibir clones por 100 dólares cada uno (Romo, 1994).

Otra limitante es que los pesos de los individuos clonados al nacimiento son anormales. Estos procedimientos dan lugar a una mayor incidencia de distocias, aunque posterior al nacimiento las tasas de crecimiento no se afectan por este procedimiento. No se conoce explicación biológica sobre este aspecto (Singla y Col., 1997). Es necesario incrementar la eficiencia de este procedimiento para eliminar el problema de gigantismo fetal que se ha encontrado en algunos becerros producidos por transferencia nuclear (Romo, 1994). En ovinos no se ha observado alteración en los pesos al nacimiento de los individuos clonados, pero sí un alargamiento en la duración de la gestación que es influenciado por el genotipo fetal (Wilmot y Col., 1997).

Es clara la necesidad de investigación básica, utilizando especies de las que se tenga un conocimiento adecuado para los fines de la investigación. Este tipo de estrategias, por su accesibilidad y bajo costo, podrían ser llevadas a cabo en animales de laboratorio, explorando más la técnica en los ámbitos celular y molecular, de manera que la solución a los problemas de las tasas de gestación y pesos al nacimiento podría obtenerse de los experimentos a partir de estas especies (Singla y Col., 1997).

2.5.3. Aplicación de la clonación en la conservación de especies

La reciente demostración de la capacidad para clonar mamíferos adultos, ha propiciado una variedad de nuevas ideas de investigación para los interesados en las especies en peligro de extinción. La clonación tiene el potencial de minimizar la pérdida de recursos

genéticos, al igual que rescatar la pérdida de material genético; por lo que permitiría expandir el número de tasas incluidos en los programas de supervivencia de especies, porque haría posible la criopreservación de embriones clonados; aunque habría que pensar con cuidado, en las especies animales que podrían ser utilizadas como las receptoras de los embriones de especies en peligro de extinción que vayan a ser clonados, y considerando: que los tipos de placentación son diferentes para cada especie; que la transferencia embrionaria interespecífica sólo funciona en las especies en las que es posible crear híbridos; que hay especies silvestres que no se reproducen en cautiverio, y también que el comportamiento materno de las hembras receptoras hacia las crías nacidas a partir de embriones clonados de especies no homólogas a ellas, podría afectar la supervivencia de los clones, etcétera (Ryder y Benirschke, 1997).

El grupo de Lanza y Col., (2000) efectuaron la primera clonación de una especie en peligro de extinción: un Gaur asiático a quien llamaron «Noé», obtenido por la transferencia de núcleos utilizando células de piel (fibroblastos) de Gaur macho y ovocito enucleado de vaca doméstica, y cuyo embrión reconstituido fue transferido en una vaca doméstica. Actualmente esperan el nacimiento del Gaur clonado y señalan que están en planes de ser clonadas especies tales como el antílope bongo, el tigre de Sumatra y el panda gigante. Asimismo, se cuenta con células preservadas de una especie ya extinta, la cabra bucardo de montaña, de España, en la que se está pensando aplicar la clonación.

2.6. Limitaciones de la bipartición de embriones

Todas y particularmente la producción de mellizos idénticos tiene la limitación del bajo número de individuos idénticos que producen. Sin embargo tienen las ventajas, como su relativa fácil aplicación, el producto de la división no requiere de programación, los embriones resultantes no sufren alteraciones antes ni después del crecimiento y, de significativa importancia en fertilidad asistida humana (FAH), están permitidas en algunos

países como complemento de las tareas de posibilitar e incrementar las tasas de gestación.

2.7. Proceso de producción de embriones *in vitro*

2.7.1. Obtención de ovocitos

Los ovocitos pueden ser obtenidos de ovarios traídos desde el matadero o de la castración de hembras, siendo la primera técnica la más común y económica para trabajos experimentales (Palma, 2001). Otra forma de obtención de ovocitos es de animales vivos, a través de la punción folicular u “ovum pick up” (OPU); técnica que fue originalmente creada para ser usada en humanos y que luego se modificó para ser usada en vacas (Pieterse y Col., 1987). Los ovocitos se pueden obtener también a través de una laparotomía y aspiración directa desde los ovarios del animal anestesiado, técnica utilizada en primates inferiores (Marshall y Col., 1998 y Mitalipov y Col., 2001).

Cuando los ovarios son obtenidos post-faenamiento de las hembras, son transportados desde el matadero, en solución salina fisiológica o solución fosfato buffer salino (PBS) con o sin la adición de antibióticos (Palma, 2001) a temperaturas variables entre 28 y 38°C (Fuladi y Col., 1998); sin embargo se llegó a la conclusión de que el transporte de ovarios a 4°C, hasta por 24 horas, no altera la viabilidad de ovocitos obtenidos.

Para la recolección de ovocitos el método más utilizado, es la aspiración de los complejos cúmulo–ovocito desde los folículos, utilizando agujas de 21 a 18 g y jeringas o bombas de aspiración (Palma, 2001), otros métodos son la disección del ovario o su desintegración enzimática, utilizando colagenasa para aislar los folículos y obtener los ovocitos directamente de ellos (Gordon, 1994).

Los folículos, de los cuales se extraen los ovocitos se prefieren de un tamaño no inferior a los 2 mm de diámetro. Lonergan y Col., (2005) concluyeron que los ovocitos obtenidos de folículos cuyo diámetro era inferior a 2 mm, luego de la fertilización *in vitro* mostraban

tasas significativamente inferiores de división y blastocistos al ser comparadas en ovocitos fertilizados *in vitro*, provenientes de folículos de tamaño superior.

2.7.2. Recuperación de complejo cúmulo-ovocito

Distintas metodologías se han evaluado para la recuperación de COCs (complejos cúmulo-ovocito) en hembras de camélidos sudamericanos. Ovarios de alpacas y llamas beneficiadas son una fuente adecuada para la recuperación de COCs, por la gran disponibilidad de ovocitos para la investigación en la estandarización de protocolos de maduración y fecundación *in vitro*; y para su utilización como receptores de núcleo de células donadoras en un programa de transferencia nuclear. La primera recuperación de ovocitos para su fecundación *in vitro* en camélidos sudamericanos se hizo en llama desmenuzando el ovario con ayuda de una hoja de afeitar. Del Campo y Col., (1994) recuperaron 27 ovocitos por llama y fue descartado el 26% de los 1324 COCs (complejos cúmulo-ovocito) recuperados. También recuperaron COCs de llama y alpaca puncionando folículos de ovarios recuperados en el camal con ayuda de una jeringa manual. Con esta metodología, Del Campo y Col., (1992) recuperaron 6,4 ovocitos por llama, utilizando ovarios procedentes del Camal Municipal de Huancavelica aspiraron folículos con agujas 21 G y jeringas estériles de 5 cc en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Universidad Nacional de Huancavelica, Ruiz y Col., (2007) recuperaron 2,2 COCs/ovario de llama y 3,5 COCs/ovario de alpaca con 66% y 69% COCs de llama y alpaca, respectivamente, seleccionados como aptos para la maduración *in vitro*, metodología de trabajo aplicada por primera vez en el Perú para la maduración de ovocitos y producción *in vitro* de embriones en camélidos sudamericanos.

2.7.3. Selección de ovocitos para maduración

Los ovocitos son seleccionados bajo una lupa estereoscópica con aumento de 40x en base a sus características morfológicas, Palma, (2001) sugiere que se deben cultivar sólo los ovocitos que posean un cúmulo denso, con un mínimo de 5 capas que cubran la

totalidad de la superficie del ovocito, que su citoplasma sea de color gris oscuro uniforme y no contenga manchas.

De Loose y Col., (1989) han sugerido un sistema de clasificación en escala, a partir de los criterios antes mencionados, para clasificar los ovocitos según su calidad. Así de categoría 1 se consideran los complejos cúmulo-ovocito (COCs) con cúmulos de capas múltiples, compacto, claro y transparente y citoplasma con granulación fina y homogéneas; categoría 2 son los del COCs cúmulos algo más oscuros y menos transparentes que los de la categoría 1, con citoplasma de granulación más gruesa y más oscura que los de la categoría 1, los de la categoría 3 poseen cúmulo menos compactos y más oscuro que los de la categoría 1 o 2 y su citoplasma tiene manchas oscuras; la categoría 4 incluye a los ovocitos con cúmulo expandido parcialmente desnudos o totalmente desnudos.

Según los mismos autores, ovocitos de mala calidad serían aquellos de tamaño muy grande o muy pequeños, los que presentan menos de tres capas de células del cúmulo o aquellos donde el cúmulo no está compacto o es de coloración muy oscura. El citoplasma de los ovocitos de mala calidad puede presentar un color no uniforme teniendo zonas muy claras o muy oscuras o ser de color uniforme pero muy claro o muy oscuro. Ovocitos de mala calidad derivan de folículos en atresia.

Lonergan y Col., (1994) demostraron la relación entre la morfología ovocitaria y el tamaño del folículo del cual proviene en su estudio comparó características morfológicas de los ovocitos, tales como presencia y número de capas de cúmulo. Concluyó que ovocitos de calidad significativamente inferior (menor número de capas de cúmulos) son obtenidos de folículos de tamaño entre 2 y 6 mm, al compararlos con ovocitos provenientes de folículos de tamaño superior a 6 mm.

2.7.4. Maduración *in vitro* de ovocitos

En el ovocito de la mayoría de mamíferos, la meiosis se inicia durante la vida fetal pero se detiene en el diploteno de la profase de la primera división meiótica, lo que ocurre cercano al nacimiento (Palma, 2001). La maduración ocurre *in vivo* al interior del folículo y es el proceso durante el cual se produce la reactivación de la división meiótica hasta alcanzar la metafase de la segunda división meiótica momento en que el ovocito retorna al arresto meiótico hasta que sea fecundado o activado artificialmente (Rath, 2001).

La primera modificación visible del núcleo, después del cultivo para la maduración, es la desaparición del nucléolo, condensación de la cromatina y la disolución de la membrana nuclear, proceso conocido como ruptura de la vesícula germinativa, una vez ocurrido esto la actividad meiótica progresa a través de la metafase I a anafase, telofase, con expulsión del primer corpúsculo polar y detenimiento en el estado de metafase II (Palma, 2001). La meiosis se reinicia sólo una vez que el ovocito es penetrado por el espermatozoides o es activado artificialmente, la finalización de la segunda división meiótica es acompañada por la extracción de un segundo corpúsculo polar en el espacio perivitelino, en esta etapa el ovocito cuenta con un número haploide de cromosomas (Gordon, 1994).

La maduración nuclear *in vitro* de ovocito de alpaca, tarda unas 24 h, es un periodo largo de tiempo si se compara con otras especies animales como la rata y la coneja, esto se debe a que los ovocitos totalmente desarrollados de rata y coneja poseen todas las proteínas esenciales para la condensación de la cromatina y la disolución de la envoltura nuclear. Mientras que los de ovocitos de vaca, alpaca cerda y ovejas están equipados sólo para la condensación de la cromatina, antes del reinicio de la meiosis (Gordon, 1994).

2.7.5. Capacitación de espermatozoides

La capacitación fisiológica de los espermatozoides empieza después de entrar en contacto con el tracto reproductivo de la hembra. Mientras el espermatozoide está en el

sistema reproductor masculino, la capacitación está inhibida por sustancias presentes en el plasma seminal. Por eso los métodos descritos a continuación, lo que hacen es eliminar el plasma seminal y de ese modo eliminar las sustancias inhibidoras de la capacitación y permitir la colocación de unos espermatozoides capacitados en el interior del útero o en una placa de Petri al lado del óvulo, para la fecundación *in vitro*. Una vez iniciada la capacitación, se pone en marcha el mecanismo de la reacción del acrosoma que ocurre cuando el espermatozoide llega a la corona radiada (Conde y Col., 2006).

La zona pelúcida es la barrera que impide la fecundación del ovocito por espermatozoides de otras especies. El espermatozoide se une y se mueve oblicuamente en la zona ayudado por las enzimas (acrosina), liberadas tanto por el acrosoma como por el oviducto y por la presencia de sustancias de reconocimiento de especie. Aunque se elimine la zona pelúcida, el espermatozoide debe pasar por el proceso de la reacción del acrosoma para que ocurra la fertilización del ovocito (Conde y Col., 2006).

2.7.6. Fecundación *in vitro*

La fecundación *in vitro* (FIV) es el procedimiento por medio del cual los 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 fecundación *in vitro* en camélidos sudamericanos podría ser una alternativa para el mejoramiento genético de camélidos domésticos y para la preservación de los camélidos silvestres.

2.7.7. Cultivo *in vitro* de embriones

El cultivo *in vitro* embrionario trata de simular las condiciones en las que se desarrolla un embrión preimplantacional desde el estadio de cigoto hasta el estadio de blastocisto. La composición de diferentes formulaciones empleadas en el cultivo embrionario, básicamente se trata de una solución salina suplementada con una fuente de energía

(piruvato, glucosa o lactosa) y una fuente proteica (suero o albúmina sérica bovina). Existen algunos medios complejos como el TCM-199, Ham's F10 o Menezo B2 que contienen vitaminas o aminoácidos en número y concentraciones variables y otros más simples que son empleados con éxito en la actualidad y que también son suplementados con aminoácidos: como es el SOFaa (Syntetic Oviductal Fluid) (Holm y Col, 1999).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

El presente trabajo de investigación, se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología y Reproducción Asistida de la Estación Experimental Agraria Canaán – INIA, ubicado en el distrito de Ayacucho, Provincia de Huamanga, Región Ayacucho, a 2 730 m.s.n.m.

3.2. Materiales

➤ Animales

La población estuvo conformada por todas las alpacas beneficiadas en el Camal Municipal de Pílpichaca – Huancavelica, 2011.

La muestra se tomó a 142 *Vicugna pacos* “alpacas” de manera no probabilística por las características de las mismas, para cuyo efecto, se consideraron los criterios de oportunidad y cantidad de beneficios. Como unidad de muestra se tomó 284 ovarios de *Vicugna pacos* “alpacas” beneficiadas del Camal Municipal de Pílpichaca.

➤ Embriones

Se utilizaron embriones producidos por fecundación *in vitro*, cultivados en medio SOF, seis días para producir mórulas y siete días para producir blastocistos.

➤ Metodología

Para el proceso de producción de embriones se utilizó el protocolo de Gabor Vajta modificado y todos los reactivos y medios de cultivo utilizados tanto para el trabajo con células, como con ovocitos y embriones, fueron de la firma Sigma (St Louis, Missoouri, Estados Unidos).

3.3.1 Aspiración folicular de ovarios *post mortem* y selección.

Para los cuatro grupos de trabajo se recolectaron aproximadamente 30 ovarios y fueron trasladados al laboratorio en solución salina más antibiótico antimicótico a una temperatura entre 33 y 35 °C. Se aspiraron los folículos entre 3 y 8 mm de diámetro con ayuda de una jeringa de 21G. El líquido folicular se colectó en tubos de 15 ml y se mantuvo a 37 °C hasta el momento de la selección de los ovocitos. Para la colecta se dejó decantar el contenido del líquido folicular y se eliminó la mayor cantidad posible de sobrenadante, el sedimento se mezcló con medio de manipulación (TCM199 con 4 mM de bicarbonato, 18 mM de HEPES, 10% de SFB y 50 µg/ml de gentamicina).

Tabla 5. Clasificación de complejos cúmulo-ovocito (COCs) de alpacas

CATEGORÍAS	CARACTERÍSTICAS
1	Provistas de cúmulos de capas múltiples (>5 capas), compacto, claro y transparente y citoplasma con granulación fina y homogénea.
2	Parcialmente rodeados por células del cúmulo (entre 2-5 capas), con cúmulos algo más oscuros y menos transparentes y con citoplasma de granulación más gruesa y más oscura que en la categoría 1.
	Con cúmulo menos compacto y más oscuro que en la categoría 1 ó

3	2 y citoplasma con manchas oscuras.
4	Incluye a los ovocitos con cúmulo expandido, parcialmente desnudos o totalmente desnudos.

Fuente: De Loose y Col., 1989.

3.3.2 Maduración *in vitro* de ovocitos

Para la maduración se seleccionaron los ovocitos grado I y II que corresponden a aquellos que presentan un citoplasma homogéneo y oscuro y abundantes células del cúmulo (no degenerado). La maduración se realizó en una placa de cuatro pocillos (Nunc, Rochester, NY, USA) (entre 25 y 30 ovocitos por pocillos), durante 30 horas a 38,5 °C y atmósfera de 5% de CO₂ en medio TCM199 suplementado con 0,6 mM de glutamina, 0,2 mM de piruvato, 0,01 U/mL de FSH y LH, 1 ug/mL de estradiol, 50 ug/mL de gentamicina y 10% SFB (Anexo 10).

3.3.3 Fecundación *in vitro* de ovocitos de *Vicugna pacos* "alpacas"

Para la fecundación *in vitro* (FIV), se utilizaron los ovocitos maduros *in vitro* (según procedimiento descrito anteriormente). Los ovocitos fueron fecundados a las 30 horas de IVM con espermatozoides de epidídimo de alpacas beneficiadas el día de la recogida de los ovarios, los cuales fueron refrigerados hasta el día de la fecundación cuya motilidad y capacidad fecundante fue chequeada previamente. La capacitación del semen se realizó siguiendo los procedimientos de "swim up" en medio TALP HEPES suplementado con 2 mM de piruvato, 50 ug/mL de gentamicina y 3,0 mg/mL de BSA (Barile y Col., 1990). Para la fecundación se transfirieron 25 ovocitos maduros a cada pocillo de una placa de cuatro pocillos y se incubaron con 1 millón de espermatozoides por 1 mL de medio de fecundación (TALP fecundación suplementado con 0,01 mg/mL de heparina, 2 mM de piruvato, 50 ug/mL de gentamicina y 6 mg/mL de BSA libre de ácidos grasos)

3.3.4 Cultivo de cigotos producidos *in vitro*

Los embriones fueron cultivados en placas de cuatro pocillos en medio SOF, suplementado con 0,4 mM piruvato de sodio, 0,2 mM de L-glutamina, 1X de aminoácidos esenciales y no esenciales, 2% de SFB, 0.1 mg/mL de ácido cítrico, 0,5 mg/mL de mioinositol y 0,3% de Albumina Sérica Bovina (BSA) libre de ácidos grasos. La placa de cultivo se selló en una bolsa hermética la cual se gasificó con una mezcla de aire que contiene 5% CO₂, 5% O₂ y 90% de N₂ artesanal. No se evaluó la división a las 24h para evitar cambios en el pH y temperatura del medio de cultivo. (Anexo 11).

3.4. Evaluación del desarrollo *in vitro* de embriones producidos de *Vicugna pacos* “alpacas”

Para determinar la capacidad de desarrollo *in vitro* de los embriones de alpaca, se determinó el porcentaje de embriones en estadio de mórula y blastocisto a los 6 y 7 días de cultivo *in vitro*. Los blastocistos fueron clasificados según el grado de desarrollo en: blastocistos expandidos y blastocistos tempranos, características morfológicas (clara definición del macizo celular interno y del trofoblasto) (Gardner y Col., 2000) (Anexo 12).

3.5. Bipartición de los embriones producidos *in vitro* en diferentes etapas del desarrollo embrionario

La bisección fue realizada en gotas de 50 µl de TCM199-Hepes + 30% de SFB (T30) a 37°C, con una microcuchilla (Ophthalmic Knife 15°, ANCON®), sin la ayuda de un microsujedor. Para esto, los embriones fueron lavados dos veces en el medio de manipulación y luego transferidos a la gota de micromanipulación, la mórula en el día 6 y blastocisto en el día 7. Los embriones fueron seleccionados y divididos despacio bajando la microcuchilla y luego con cuidado moviéndolo de un lado a otro.

En el caso de blastocisto, la microcuchilla fue orientada en el centro del embrión de modo que el macizo celular interno (ICM) fuera dividida tan uniformemente como sea posible, y luego de ello pasar la mitades en el medio SOF (Fluido del Oviducto Modificado) por 24h. La calidad de los hemi-embryones fue evaluada después de las 24 horas de la bisección.

3.6. Evaluación de los hemi - embriones generados

Para determinar la capacidad de desarrollo post bipartición *in vitro* de los embriones de alpaca, se determinó el porcentaje de embriones regenerados en estadio de mórula y blastocisto a las 24h de cultivo *in vitro* (Anexo 13).

Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron repetidos al menos cuatro veces. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos fueron comparadas utilizando el análisis de varianza (ANOVA). Se utilizó la prueba de T de student para determinar si existe diferencia significativa. El modelo estadístico utilizado para describir la observación fué.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Los componentes del modelo fueron:

Y_{ij} = observaciones (tasa de regeneración).

μ = media general.

T_i = efecto de los tratamientos

e_{ij} = error asociado a cada observación.

IV. RESULTADOS

Tabla 6. Estadíos embrionarios de *Vicugna pacos* "alpacas". EEA-CANAAN – INIA – Ayacucho. 2011.

	N° de Ovarios	N° Ovocitos Categoría 1 y 2	N° Ovocitos Fecundados	N° Ovocitos Cultivados	N° Mórulas día 6	% Mórulas día 6	TOTAL %
Grupo 01	13	60	60	50	8	16	17,65
Grupo 02	30	100	100	95	16	16,8	
Grupo 03	40	128	128	125	24	19,2	
Grupo 04	55	120	120	118	22	18,6	

Tabla 7. Ovocitos y blastocistos de Vicugna pacos "alpacas". EEA-CANAAN – INIA – Ayacucho. 2011.

	N° Ovarios	N° Ovocitos	N° Ovocitos Fecundados	N° Ovocitos Cultivados	N° Blastocisto día 7	% Blastocisto día 7	TOTAL %
Grupo 01	40	100	100	98	17	17,34	17,17
Grupo 02	20	70	70	65	11	16,90	
Grupo 03	48	100	100	95	16	16,84	
Grupo 04	38	130	130	127	22	17,60	

Tabla 8. Media y desviación típica de los estadios de mórula y blastocisto. E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011.

Producción de embriones	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Mórula	4	17,6500	1,50000	0,75000
Blastocisto	4	17,1700	0,36313	0,18157

* $p > 0.05$

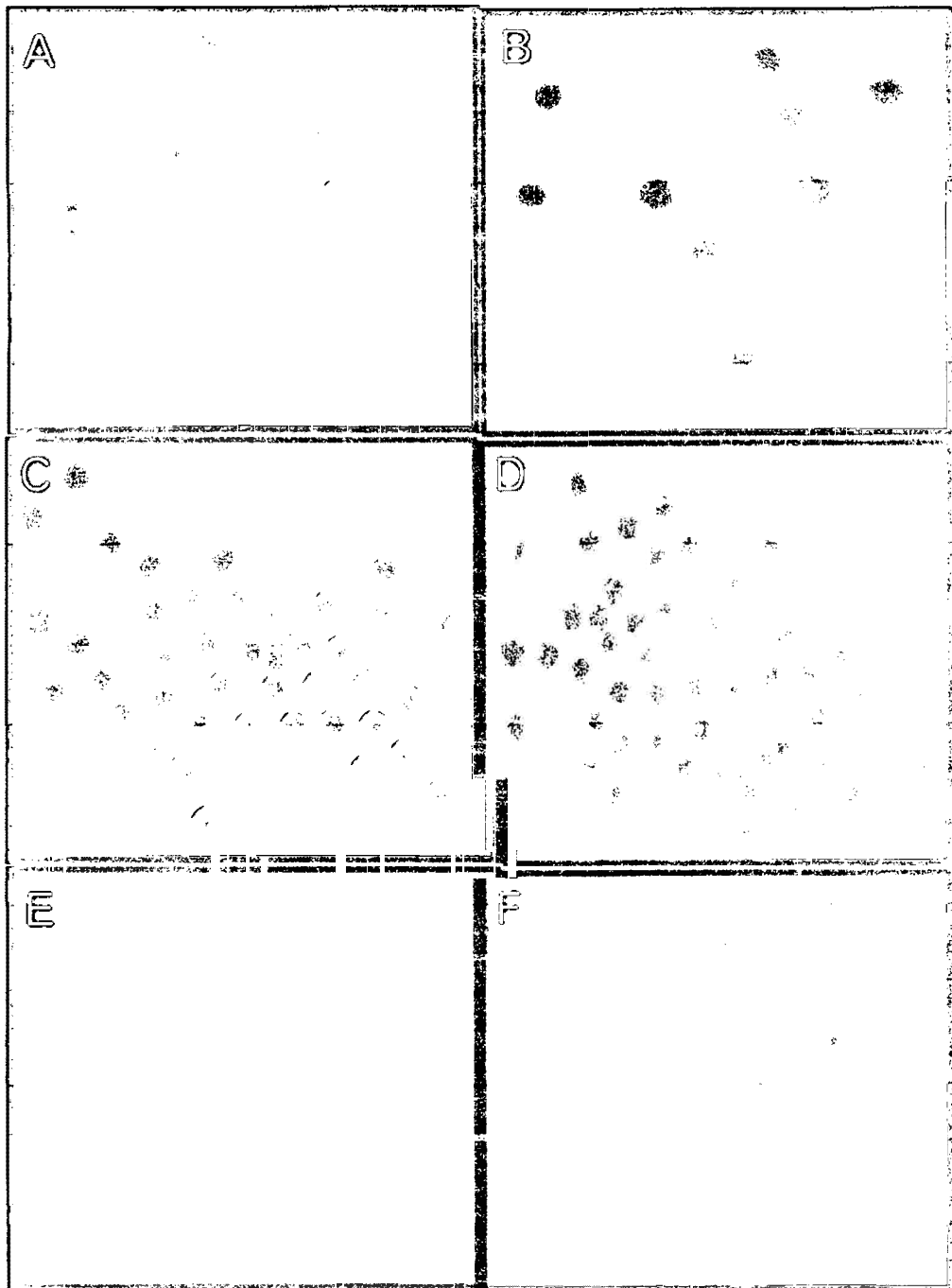


Figura N° 1. Etapas de la producción de embriones de alpaca por fecundación *in vitro* (FIV). (A) Ovocitos inmaduro; (B) Ovocitos maduros; (C) Cigotos; (D) Cigotos 24h post fecundación; (E) Mórula; (F) Blastocisto. E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011.

Tabla 9. Regeneración de embriones de *Vicugna pacos* "alpacas". E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011.

	N° Ovocitos Cultivados	N° Mórulas	% Mórulas	N° Hemi-embryones	N° Hemi-embryones regenerados	Regeneración %	TOTAL %
Grupo 01	50	8	16	16	10	62,50%	64,08
Grupo 02	95	16	16,8	32	21	65,60%	
Grupo 03	125	24	19,2	48	31	64,58%	
Grupo 04	118	22	18,6	44	28	63,63%	

Tabla 10. Regeneración de embriones de *Vicugna pacos* "alpacas". E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011.

	N° Ovocitos Cultivados	N° Blastocistos	% Blastocistos	N° Hemi-embryones	N° Hemi-embryones regenerados	Regeneración %	TOTAL %
Grupo 01	98	17	17,34	34	25	73,50%	72,68
Grupo 02	65	11	16,90	22	16	72,70%	
Grupo 03	95	16	16,84	32	23	71,80%	
Grupo 04	127	22	17,60	44	32	72,70%	

Tabla 11. Media y desviación típica de embriones de *Vicugna pacos* "alpacas". E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011.

Elpartición de embriones	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Mórculas	4	64,0775	1,32404	0,66202
Blastocisto	4	72,6750	0,69462	0,34731

* $p < 0,05$

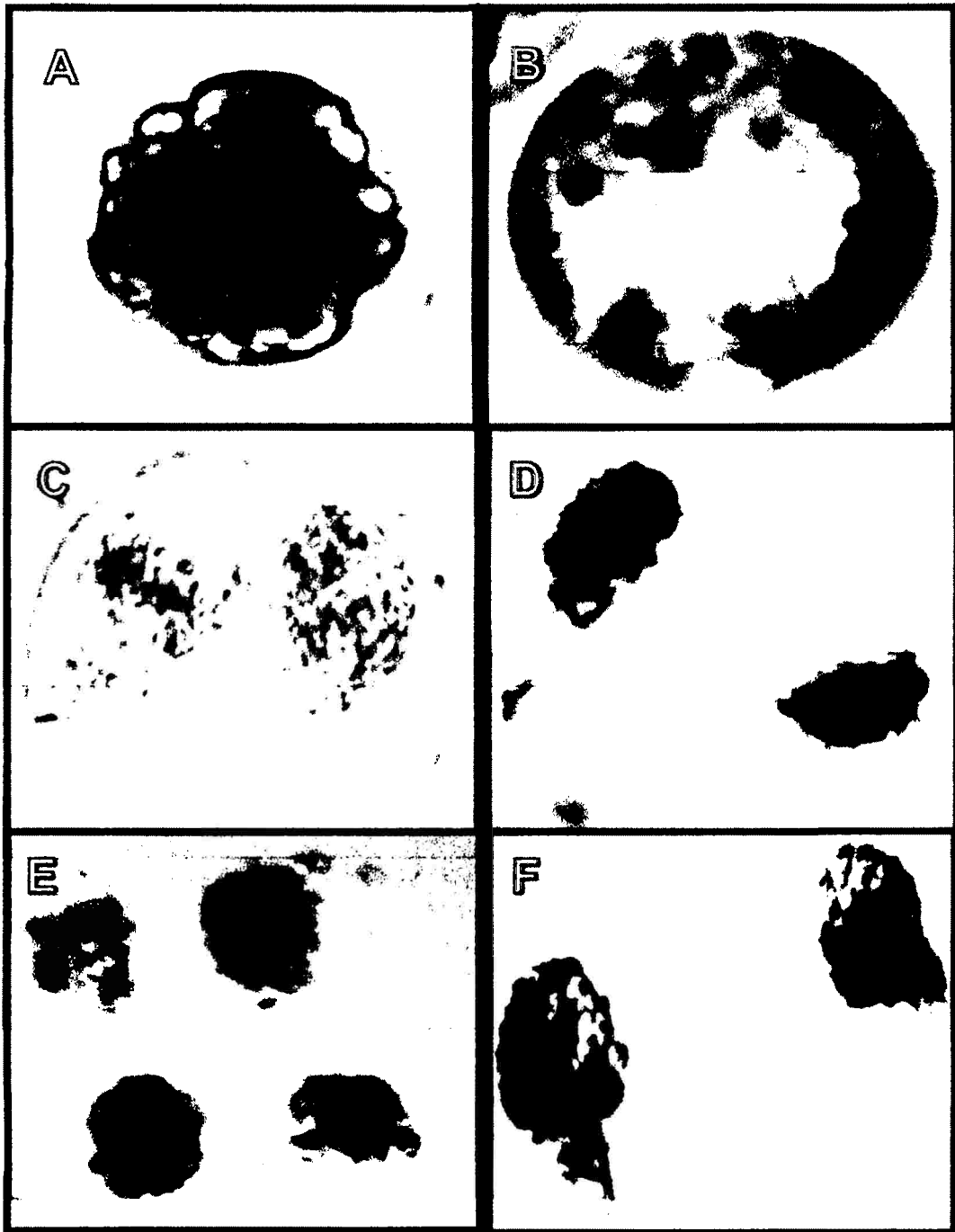


Figura N° 2. Bipartición de embriones de alpaca en estadios de mórula y blastocisto. (A) Mórula compacta, (B) Mórula dividida, (C) Hemi mórulas, (D) Blastocisto Expandido, (E) Blastocito dividido, (F) Hemi blastocistos. E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011.

V. DISCUSIÓN

La multiplicación de gametos y embriones, empleando las particularidades haploides o diploides del momento de su desarrollo, constituyen una forma de incrementar la tasa de gestación y así la eficiencia reproductiva para la producción animal, la reproducción asistida en medicina humana y la investigación en todas las especies.

Se logró 17,65 % en tasas de producción de embriones en estadio de mórula y 17,17% en estadio de blastocisto, donde estadísticamente no existe diferencia significativa en porcentajes de producción, dando como resultado una eficiente producción de embriones producidos por fecundación *in vitro*.

La utilización de la fecundación *in vitro* en camélidos sudamericanos podría ser una alternativa para el mejoramiento genético de camélidos domésticos y para la preservación de los camélidos silvestres. Sin embargo existen pocos reportes de fecundación *in vitro* (FIV) en camélidos sudamericanos (Del Campo, y Col., 1995; Gómez y Col., 2002; Conde y Col. 2008 y Ratto y Col., 2007) y hasta la fecha no ha nacido cría alguna de camélidos sudamericanos con la aplicación de esta técnica.

Del Campo y Col., (1994) separaron epidídimos de testículos de llamas beneficiadas, obtuvieron los espermatozoides por centrifugación en gradiente de Percoll y fecundaron ovocitos de hembras beneficiadas madurados *in vitro*

logrando por primera vez en llamas el desarrollo de embriones producidos por FIV. Se recolectaron 1324 complejo cúmulos ovocitos (COCs) de 98 ovarios de llamas beneficiadas, permitiéndoles disponer de gran cantidad de ovocitos para realizar diferentes tratamientos para la FIV, fijar ovocitos para evaluar el estadio después de la FIV. De ellos 234 ovocitos inseminados fueron co-cultivados con células epiteliales de oviducto de llama previamente preparadas, 32% dividieron (embriones de 2 células) a las 48 h de evaluación y a los nueve días de evaluación 15,8% detuvo su desarrollo entre 2-16 células, 5,6% desarrollaron hasta mórulas, 6,0% entre blastocistos tempranos y expandidos y 4,7 blastocistos eclosionados.

Conde y Col., (2006) utilizaron un sistema similar para FIV en llamas, mientras que Del Campo y Col., (1994) recuperaron los gametos de animales vivos, de manera que la producción de embriones por fecundación *in vitro* (FIV) puede contribuir al mejoramiento genético si se logra recuperar gametos de animales de comprobada calidad genética. Los ovocitos fueron recuperados por punción folicular de ovarios expuestos por laparatomía lateral de hembras superovuladas y los espermatozoides fueron recuperados por electroeyaculación de llamas macho. El semen fue tratado con colagenasa para reducir su viscosidad. Las tasas de división (formación de cigotos) a las 48 h de fecundación fueron 56% y 50% con y sin agentes capacitantes de espermatozoides (heparina, penicilamina e hipotaurina). Conde y Col., (2008) reportaron 40,8% y 42,2% de división a los dos días y 35% y 47% de blastocistos a los ocho días con y sin agentes capacitantes. Demostraron que la colagenasa no afecta la capacidad fecundante del semen y se puede producir embriones de llamas por FIV con semen fresco.

Gómez y Col., (2002) fecundaron con semen de epidídimo de llamas beneficiadas, ovocitos de alpaca recuperados por punción de los folículos de ovarios expuestos por laparotomía ventral de hembras superovuladas. Los cinco

complejo cúmulos ovocitos (COCs) que fueron fecundados y cultivados *in vitro* desarrollaron hasta mórula a los seis días de evaluación, ninguno continuo el desarrollo hasta el estadio de blastocisto. Este sería el primer reporte en la producción de embriones híbridos de alpaca-llama después de una fecundación *in vitro* heteróloga, experiencia que fue repetida por Ratto y Col., (2007). Sin embargo, Del Campo y Col., (1995), indican que fecundaron *in vitro* ovocitos recuperados de alpacas superovuladas con semen de llama y los embriones producidos desarrollaron hasta el estadio de blastocisto expandido. No existe hasta la fecha reporte científico en el mundo de la producción de un embrión *in vitro* utilizando los dos gametos en alpacas. Sin embargo en el Perú más de un grupo de investigación viene trabajando en este camino y existe ya el primer reporte periodístico de la obtención de las primeras segmentaciones (embriones de dos células) de alpaca en la Universidad Nacional Agraria la Molina y es muy probable que en un tiempo muy cercano se reporten los primeros blastocistos de alpaca producidos por fecundación *in vitro*. La importancia de lograr blastocistos radica en que es este estadio de desarrollo en que los embriones pueden ser transferidos para lograr una preñez exitosa.

Trazorras y Col., (2011) utilizando medios definidos, tales como SOF y DMEM-F12, que son más fáciles de preparar que las células somáticas en monocapa y que presentan menos riesgo de contaminación y utilizando espermios colectados con electroeyaculador y como medio capacitante de espermatozoides el Androcol-E. obtuvieron 20 y el 15% de tasa de blastocistos con SOFaa y DMEM-F12, respectivamente.

Berland y Col., (2011) utilizando medios definidos como SOF y DMEM-F12, logró obtener 21% de embriones en la fase de blastocistos, esto con la utilización de cultivo en monocapa.

A partir de la década de 1980 se inició en Cambridge (Willadsen, 1989) una nueva fase con el desarrollo de la microcirugía de embriones (MC) con la producción de mellizos idénticos. Esta comprende la micromanipulación de embriones en estadio de mórula o blastocisto, obtenido por lavajes no quirúrgicos, con la división en dos partes iguales (hemi-embryones). Sus particularidades la convierten en una técnica interesante no solamente por aumentar la eficiencia reproductiva de un individuo o factor determinado, sino también por permitir la disponibilidad de animales idénticos en un programa de TE como así también para ser empleados como modelo de investigación (Brem, 1986). La técnica fue rápidamente adoptada y es aplicada actualmente en los programas convencionales de transferencia de embriones (TE) en países con alta disponibilidad tecnológica (Gray y Col., 1991; Kippax y Col., 1991 y Lange y Col., 1991). Existe sin embargo escasa información sobre la aplicabilidad de esta técnica en países bajo condiciones extensivas de producción y con el empleo de receptoras de razas productoras de carne o sus cruza, cuya rusticidad las hace más adecuadas a esos sistemas de producción que las razas lecheras, pero cuya capacidad de gestar y criar dos individuos constituye un interrogante (Palma, 2001).

En el presente trabajo de investigación se logró, 64,08% de tasa de regeneración en la división de mórulas y 72,68% en la división de blastocistos, donde estadísticamente existe diferencia significativa en la etapa de manipulación, dando como resultado una eficiente producción de hemi-embryones sin la utilización de micromanipuladores y tampoco de micro instrumentos. Sin embargo se han realizado trabajos similares en roedores como lo reportado por Nagashima y Col., (1984) quienes dividieron mórulas compactas luego de un ablandamiento de la zona pelúcida con la ayuda de micromanipuladores, luego de 24 h de cultivo post división obtuvieron 57,3% de

blastocistos, 15,3% de eudoblatocistos y 6,9% de pseudoblastocistos Xiangzhong y Col., (1987) dividieron mórulas y blastocistos de conejos con la ayuda de micromanipuladores y los compararon con embriones intactos, obteniendo 77% de implantación con embriones divididos y 78% de implantación con embriones intactos. Por otro lado, Reichelt y Niemann, (1993) dividieron mórulas y blastocistos de cerdos obteniendo como resultado un 66% en tasas de regeneración utilizando micromanipuladores, Morton y Col., (2006) realizaron trabajos en ovejas donde dividieron embriones en estadio de blastocisto y comparados con embriones intactos, mostrando un 33,3 % de implantación con hemi-embryones y 80,9% de implantación con embriones intactos, respectivamente. Tao y Col., (2008) reportaron que al dividir embriones en estadios de mórula, blastocisto temprano y blastocisto expandido a las 24 h de cultivo post división se obtiene un 64%, 55,4% y 74,3% de tasas de regeneración post 24 h de cultivo luego de la división, respectivamente. Una técnica comparable aplicada a los embriones de alpaca en el presente trabajo en los estadios de mórula y blastocisto en los días seis, siete y ocho permitió a Gatica, y Col., (1984) y Willadsen y Col., (1984) obtener un 94% de corderos nacidos respecto al número de embriones de partida, la bisección de blastocistos en los días 9 y 10 permite obtener corderos con una eficacia elevada en el estadio de blastocisto. Chesne y Col., (1987) obtuvieron un 81% de partos en ovejas, Shoukhrat y Col., (2002) compararon la separación de blastómeros versus la bisección de embriones obteniendo 85% y 95% respectivamente en tasas de regeneración con embriones de *Macacus rhesus*.

En animales mayores se han obtenido resultados similares al presente trabajo, es el caso de Ozil, (1983) quien reporta que al dividir embriones con micromanipuladores en estadio de blastocisto, estas mitades al colocarlas en

zonas pelúcidas vacías y luego de la transferencia se obtuvo un 72% de tasas de preñez.

Voelkel y Col., (1984) demostraron que los hemi-embriones provenientes de mórulas y blastocistos no requerían de zona pelúcida para su desarrollo *in vivo*, Gyu Jin Rho y Col., (1998) dividieron embriones de vacas con ayuda de micromanipuladores en estadios de mórula y blastocisto producidos *in vitro* donde obtuvo 61% de regeneración en mórulas y 91% de regeneración en blastocisto luego de las 24 h de cultivo. Palma y Col., (1995) realizaron la transferencia de embriones de la raza Aberdeen Angus a receptoras Angus x Criolla, donde obtuvieron 52,9% de partos de los cuales el 77,9% fueron nacimientos simples y 22,2% nacimientos dobles.

El único estudio de bipartición de embriones de bovinos sin la utilización de micromanipuladores fue reportado por Pinter y Col., (1986) obteniendo tasas de regeneración post 24 h de cultivo luego de la división de 68% y 82% en mórulas y blastocistos respectivamente. Estos resultados son semejantes a lo hallado en el presente trabajo de investigación que corresponde a 64,08% y 72,68% en mórulas y blastocistos, respectivamente.

Se obtuvo hemi-embriones con tasas favorables por bipartición sin la utilización de micromanipuladores determinándose que en el estadio de blastocisto se obtienen mejores tasas de regeneración, obteniéndose un 64,08% y 72,68% de hemi-embriones respectivamente. Existe diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) entre los tratamientos instaurados, es decir, que al dividir embriones en el estadio de blastocisto luego de la manipulación se obtienen mejores tasas de regeneración con respecto al dividirlos en estadio de mórula.

VI. CONCLUSIONES

1. Se logró estandarizar la técnica de bipartición de embriones con instrumentos no convencionales obteniendo clones idénticos con bajos costos de producción.
2. Se obtuvieron hemi-embryones transferibles por bipartición sin la necesidad de micromanipuladores a partir de mórulas (64,08%) y de blastocistos (72,68%); demostrándose así que en el estadio de blastocisto, con la técnica de bipartición, se obtiene mejores tasas de regeneración.

VII. RECOMENDACIONES

1. Evaluar nuevos protocolos de producción *in vitro* de embriones en *Vicugna pacos* "alpacas", para optimizar la producción y también evaluar la bipartición con embriones en especies silvestres de importancia económica como la vicuña, debido a que en esta especie la producción de embriones es escasa.
2. Realizar la producción de embriones *in vitro* de animales élite con la obtención de ovocitos *in vivo* para luego ser manipulados y transferidos y observar cómo responde estos animales a la implantación de hemi-embryones y también hacer trabajo de investigación con la transferencia hetero-específica de hemi-embryones.
3. Ampliar la aplicación de la técnica de bipartición de embriones en animales menores y fauna silvestre en peligro de extinción.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aba, M.; Kindahl, H.; Forsberg, M.; Quiroga, M. and Auza, N.** 2000. Levels of progesterone and changes in prostaglandin F^{2α} release during luteolysis and early pregnancy in llamas and the effect of treatment with flunixin meglumine. *Animal Reproduction Science*. 59:87-97.
2. **Adaniya, G.; Rawlins, R.; Quigg, J.; Roblero, L.; Miller, I. and Zaneveld, L.** 1993. First pregnancies and live births from transfer of sodium alginate encapsulated embryos in a rodent model. *Fert. Steril.* 59(3): 652-6.
3. **Adams, G.; Sumar, J. and Ginter, O.** 1990. Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *J Reprod Fertil.* 90: 535-545.
4. **Agca, Y.; Monson, R.; Northey, D.; Peschel, D.; Schaefer, D. and Rutledge, J.** 1998. Normal calves from transfer of biopsed, sexed and vitrified IVP bovine embryos. *Theriogenology* 50: 129- 145.
5. **Alvarado, E.** 2003. Avances en la biotecnología de la reproducción animal. En Resúmenes de la XXVI Reunión Científica Anual Peruana de Producción Animal. Pucallpa – Perú.
6. **Baker, R.** 1985. Commercial splitting of bovine embryos. *Theriogenology* 23: 3-12.
7. **Barile, V.; Dell'Aquila, M.; Cinone, M. and Minoia, P.** 1990. In vitro maturation and fertilization of follicular oocytes in cattle. *Boll Soc Ital Bio Sper.* 66:899-906.

8. **Berland, M.; Von Baer, A.; Ruiz, J.; Parraguez, V.; Morales, P.; Adams, G. and Ratto, M, 2011: In vitro fertilization and development of cumulus oocyte complexes collected by ultrasound guided follicle aspiration in superstimulated llamas. *Theriogenology* 75, 1482–1488.**
9. **Bourke, D. and Adam, C. 1992. Ovulation, superovulation and embryo recovery in llamas. 12th International Congress on Animal Reproduction.**
10. **Bourke, D.; Kyle, C.; McEVOY, T.; Young, P. and Adam, C. 1995. Superovulatory responses to eCG in llamas (*Lama glama*). *Theriogenology* 44: 255-268.**
11. **Bromhall, J. 1975. Nuclear transplantation in the rabbit egg. *Nature* 258:719-721.**
12. **Brem, G. 1986. Splitting and sexing of bovine embryos FAO Expert Consultation on Biotechnology for Livestock Production and Health Roma, 6-10 October.**
13. **Campbell, K.; McWhir, J.; Ritchie, W. and Wilmut, I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380: 64-66.**
14. **Casas, E y Betancourt, M. 1998. Clonación: una alternativa en la producción animal. En: *Biología de la Reproducción* J. Velásquez Moctezuma, editor. México, DF Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, pp. 83-499.**
15. **Conde, P.; Herrera, C.; Chaves, M.; Giuliano, S.; Director, A; Trasorras, V.; Pinto, M.; Carchi, M.; Stivale, D.; Rutter, B.; Agüero, A.;**

- Miragaya, M. and Pasqualini, R. 2006: *In vitro* production of llama embryos by IVF or ICSI. *Reproduction, Fertility and Development* 19 (1): 237–238.
16. Conde, P.; Herrera C.; Trasorras, V; Giuliano, S.; Director, A.; Miragaya, M.; Chaves, M.; Sarchi, M.; Stivale, D.; Quintans, C.; Agüero, A.; Rutter, B. and Pasqualini, S. 2008: *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Anim Reprod Sci* 109, 298–308.
17. Cervantes, M, 2008. Momento óptimo post cópula para la recuperación de embriones del útero de alpaca mediante método quirúrgico. Tesis de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 43 p.
18. Cosio, M, 2000. Morfología de los embriones de alpaca (*Lama pacos*) de la raza huacaya del tercer al décimo día de gestación temprana “Centro experimental La Raya – Cusco 1999”. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. Universidad Católica Santa María. 23 p.
19. Chan, A.; Dominko, T.; Luetjens, C.; Neuber, E.; Martinovich, C. and Hewitson, L. 2000. Clonal propagation of primate offspring by embryo splitting. *Science* 287: 317-319.
20. Cheong, H.; Takahashi, Y. and Kanagawa, H. 1993. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol. Reprod.* 48 (5): 958-963.
21. Chesne, P.; Colas, G.; Cognie, Y.; Guerin, C. and Sevellec, C. 1987. Lamb production using superovulation, embryo bisection, and transfer. *Theriogenology* 27 751–757.

22. Del Campo, M.; Donoso, M. and Del Campo, C. 1995. *In vitro* maturation of Llama (*Lama glama*) oocytes. Proc 12th Int Cong Anim Reprod, (01): 324.
23. Del Campo, M.; Del Campo, C.; Donoso, M.; Berland, M. and Mapletoft, R. 1994. *In vitro* fertilization and development of *Lama glama* oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. Theriogenology (41): 1219-1229.
24. De Loose, F.; Van Vliet, P.; Van Maurik, P. and Kruip, T. 1989: Morphology of inmadure oocytes. *Gamete Res.* (24): 197–204.
25. Eaton, N.; Niemeyer, G. and Doody, M. 1990. The use of an alginic acid matrix to support *in vitro* development of isolated murine blastomeres. *J. In vitro Fert. Embryo Transf.* 7(1): 28-32.
26. Edwards, R. y Beard, H. 1998. How identical would cloned children be? An understanding essential to the ethical debate. *Hum. Reprod. Update* 4(6):791-811.
27. Evangelista, S.; Cordero, A.; Santini, A.; Vazques, M.; Huanca, y T.; Huanca, W. 2007. Efecto Del tratamiento con progesterona-eCG sobre La calidad embrionaria en llamas. APPA–ALPA– Cusco, Perú.
28. Fuladi, A.; Waddington, D. and Campbell, K. 1998. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development *in vitro*: A comparartive evaluation of antral follicle culture with other methods. *Biol. Reprod.* (50):390-400.
29. Gardner, D.; Lane, M.; Spitzer, A. and Batt, P. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst

- stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol. Reprod.* 50:390–400.
30. Gatica, R.; Boland, M.; Crosby, T. and Gordon, I. 1984. Micromanipulation of sheep morulae to produce monozygotic twins. *Theriogenology.* 21:555-560.
31. Geber, S.; Winston, R. and Handyside, A. 1995. Proliferation of blastomeres from biopsed cleavage stage human embryos *in vitro*: an alternative to blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis. *Hum. Reprod.* 10(6): 1492-1496.
32. Geber, S. and Sampaio, M. 1991. Blastomere development after embryo biopsy: a new model to predict embryo development and to select for transfer. *Hum. Reprod.* 14(3): 782-786.
33. Gordon, I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. CAB internacional, Cambridge-United Kingdom.
34. Gómez, G.; Ratto, M.; Berland, M.; Wolter, M. and Adams, G, 2002. Superstimulatory response and oocyte collection in alpacas. *Theriogenology* 57, 584.
35. Gray, K.; Bondioli, K. and Betts, C. 1991. The commercial application of embryo splitting in beef cattle *Theriogenology* 35, 37-44.
36. Gyu Jin Rho; Walter, H.; Johnson, A.; Keith, J and Betteridge, K. 1998. Cellular composition and viability of demi- and quarter-embryos made from bisected bovine morulae and blastocysts produced *in vitro*. Departments of

Biomedical Sciences, and 2Population Medicine University of Guelph, Guelph, ON, Canada N1G 2W1.

- 37. Heyman, Y.; Vignon, X.; Chesné, P.; Le Bourhis, D.; Marchal, J. and Renard, J. 1998. Cloning in cattle: from embryo splitting to somatic nuclear transfer. *Reprod. Nutr. Dev.* 38(6):595-603.**
- 38. Holm, P.; Booth, P.; Schmidt, M.; Greve, T. and Callesen, H. 1999. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*. 52:683-700.**
- 39. Huhtinen, M.; Peippo, J. and Bredbacka, P. 1997. Successful transfer of biopsed equine embryos. *Theriogenology* 48(3): 361-7.**
- 40. King, W.; Picard, L.; Bousquet, D. and Goff, A. 1992. Sex-dependent loss of bisected bovine morulae after culture and freezing. *J. Reprod. Fertil.* 96(2):453-459.**
- 41. Kippax, I.; Christie, W. and Rowan, T. 1991. Effects of method of splitting, stage of development and presence or absence of zona pellucida on foetal survival in commercial bovine embryo transfer of bisected embryos *Theriogenology* 35, 25-35.**
- 42. Kokalj-Vokac, N.; Zagorac, A.; Pristovnik, M.; Bourgeois, C. and Dutrillaux, B. 1998. DNA methylation of the extraembryonic tissues: an *in situ* study on human metaphase chromosomes. *Chrom. Res.* 6: 161-166.**
- 43. Lanza, R.; Cibelli, J.; Blackwell, C.; Cristofalo, V.; Francis, M. and Baerlocher, G. 2000. Extension of cell lifespan and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* 288: 665-669.**

- 62. Morton, K.; Anthony, M.; Rowe, W.; Chis, M. and Gareth, E. 2006. In vitro and in vivo survival of bisected sheep embryos derived from frozen-thawed unsorted, and frozen-thawed sex-sorted and refrozen-thawed ram spermatozoa. Centre for Advanced Technologies in Animal Genetics and Reproduction (ReproGen), Faculty of Veterinary Science, The University of Sydney, NSW 2006, Australia.**
- 63. Novoa, C. y Franco, E. 1999. Dosis de gonadotropinas (eCG y hCG), superovulación y obtención de embriones en alpacas. Revista de Investigaciones Veterinarias. Perú. 10(1): 48-53.**
- 64. National Bioethics Advisory Commission. 1997. Report on cloning by the US Bioethics Advisory Commission: ethical considerations. *Hum. Reprod. Update* 3: 629-641.**
- 65. Nagashima, H.; Matsui, K.; Sawasaki, T. and Kano, Y, 1984. Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morulae. Stock Farm, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Iwama, Ibaraki 319-02, Japan.**
- 66. Navarro, M.; Rosado, A; Ferando, H. 2003. Técnicas de clonación de embriones. *Ciencia Veterinaria*. Vol 9: 35-74.**
- 67. Nicholas, F. 1983. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. *Anim. Prod.* 36: 341-353.**
- 68. Ozil, J. 1983. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. I.N.R.A., Station centrale de Physiologie animale, 78350 Jouy-en-Josas, France.**

- 69. Palma, G.; Zakhartchenko, V.; Alberio, R.; Kaiser, G.; Aller, J. and Alberio, R. 2002. Production of adult somatic cell clones from bovine granulosa cells cultured to full confluence Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (IETS) Theriogenology 57, 441.**
- 70. Palma, G.; Wennigerkind, H.; Modi, H. y Brem, G. 1995. Biotecnologías aplicadas en la reproducción bovina estado actual y aplicaciones futuras. Rev. Arg. Prod. Anim. 15: 159-165.**
- 71. Palma, G. 2001. Biotecnología de la reproducción. Ed. INTA. Bariloche-Argentina.**
- 72. Pierce, K.; Michalopoulos, J.; Kiesslin, A.; Seibel, M.; and Zilberstein, M. 1997. Preimplantation development of mouse and human embryos biopsed at cleavage stages using a modified displacement technique. Hum. Reprod. 12:351356.**
- 73. Pinter, Z.; Szabad, J. and Petho, A. 1986. Embryo-splitting without a micromanipulator. 37 The Annual meeting of the European Association for Animal Production, 189.**
- 74. Prather, R. and First, N. 1990. Cloning of embryos. J. Reprod. Fert. Suppl. 40: 227-234.**
- 75. Prather, R.; Barnes, F.; Sims, M.; Rob, J.; Eyestone, W. and First, N. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. Biol. Reprod. 37:859-866.**

76. Pieterse, M.; Kappen, K.; Kruij, T. and Tarverme, M. 1987. Aspiration of bovine oocyte during transvaginal ultrasound scanning of the bovine ovaries. *Theriogenology* (30):751-762.
77. Ratto, M.; Berland, M.; Huanca, W.; Singh, J. and Adams, G, 2007. In vitro and in vivo maturation of llama oocytes. *Theriogenology* 63, 2445–2457.
78. Rath, D. 2001. Producción *in vitro* de embriones porcinos. En: "Biotecnología de la Reproducción". (Palma, G. Editor). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Bariloche-Argentina.
79. Rexroad, C. and Powell, A. 1997. Culture of blastomeres from *in vitro*-matured, fertilized, and cultured bovine embryos. *Molec. Reprod. Dev.* 48:238-245.
80. Reicheit, B. and Niemann, H. 1994. Generation of identical twin piglets following bisection of embryos at the morula and blastocyst stage. *J. Reprod. Fert.* 100(1): 163-172.
81. Ruiz, J.; Correa, J.; Ayuque, G.; Landeo, L.; Yaranga, M. y Zacarías, A. 2007. Producción *in vitro* de embriones partenogénéticos de alpaca y llama. En: "I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos". Huancavelica-Perú.
82. Romo, S. 1994. Biotecnología reproductiva: avances en ganado bovino. *Boletín Técnico Internacional*. Schering-Plough División Veterinaria, I-8.
83. Ryder, O. and Benirschke, K. 1997. The potential use of "cloning" in the conservation effort. *Zoo. Biol.* 116: 295-300.

- 84. Rorie, R. and Godke, R. 1987.** Bisection of bovine embryos. In: Embryotechnologies to domestic animals T. Greve, editor. *Copenhagen*. 1-9.
- 85. Saito, S. and Niemann, H. 1991.** Effects of extracellular matrices and growth factors on the development of isolated porcine blastomeres. *Biol. Reprod.* 44(5): 927-36.
- 86. Serrano, H. y García-Suárez, M. 1997.** De niños probeta y animales clonados. *Cemanáhuac* 36: 1-4.
- 87. Seidel, G. 1993.** Production of genetically identical sets of mammals: cloning *J. Exp. Zool.* 228:347-354.
- 88. Schmidt, M.; Smith, S.; Avery, B.; Purwantara, B. and Greve, T. 1992.** Blastomere content of cultured/frozen bovine demiembryos. *Acta Vet. Scand.* 33(4): 363-7.
- 89. Sumar, J. y Leyva, C. 1981.** Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*Lama pacos*). Memorias del IV convención internacional sobre camélidos sudamericanos. Punta Arenas - Chile.
- 90. Sumar, J. y Franco, E. 1974.** Ensayo de Transferencia de Embriones en Camélidos Sudamericanos. En: Informe Final (IVITA). UNMSM. Lima, Perú.
- 91. Singla, S.; Manik, R. and Madan, M. 1997.** Application and commercial aspects of embryo cloning in cattle and buffaloes-a review. *Indian J. Dairy Sci.* 50: 75-82.
- 92. Stice, S. and Keefer, C. 1993.** Multiple generational bovine embryo cloning. *Biol. Reprod.* 48: 715-719.
- 93. Solter, D. 1996.** Lambing by nucleartransfer. *Nature* 380: 24-25.

- 94. Shoukhrat, M.; Mitalipov, Y.; Richard, R.; Yeoman, R.; Hung-Chih Kuo and Don P. Wolf. 2002. Monozygotic Twinning in Rhesus Monkeys by Manipulation of In Vitro-Derived Embryos. Oregon Regional Primate Research Center, Oregon Health & Science University, Beaverton, Oregon 97006.**
- 95. Tanaka, H. and Kanagawa, H. 1997. influence of combined activation treatments on the success of bovine nuclear transfer using young and aged oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 49:113-123.**
- 96. Tao, Y.; Cheng, L.; Zhang, M.; Li, B.; Ding, J.; Zhang, Y.; Fang, F.; Zhang, X. and Maddox-Hyttel, P. 2008. Ultrastructural changes in goat interspecies and intraspecies reconstructed early embryos. *Zygote.* 16:93-110.**
- 97. Taylor, S.; Taylor P.; James, A. and Godke, R. 2000. Successful commercial embryo transfer in the Llama (*Lama glama*). *Theriogenology.* 53, 1-344.**
- 98. Trazorras, V.; Giuliano, S.; Chaves, G.; Neild, D.; Agüero, A.; Carretero, M.; Pinto, M.; Baca, C.; Alonsom A.; Rodriguez, D.; Morrell, J. and Miragaya, M. (2011). 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 Dom Anim* doi: 10.1111.**
- 99. Urven, L.; Weng, D.; Schumaker, A.; Gearhart, J. and McCarrey, J. 1993. Differential gene expression in fetal mouse germ cells. *Biol. Reprod.* 48: 564-574.**

- 100. Vásquez, M.; Cervantes, M.; Cordero, A.; Cárdenas, O. y Huanca, W.**
2007. Estudio preliminar sobre Vitrificación de embriones de alpacas
Resumen XXX Reunión Asociación Peruana de Producción Animal - Cuzco,
Perú.
- 101. Vajta, G.; Lewis, I.; Hyttel, P.; Thouas, G. and Trounson, A.** 2001.
Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning*. 3:89-95.
- 102. Voelkel, S.; Humes, P. and Godke, R.** 1984. Pregnancy rates resulting
from non-surgical transfer of micromanipulated bovine embryos. *Proc 10th
Int Congr Anim Reprod*; 10:251- 253.
- 103. Wassarman, P.** 1999. Zona pellucida glycoprotein mZP3: a versatile
player during mammalian fertilization. *J. Reprod. Fert.* 116: 211- 216.
- 104. Willadsen, S.** 1979. A method for culture of micromanipulated sheep
embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature* 277: 298.
- 105. Wilton, L. and Trounson, A.** 1989. Biopsy of preimplantation mouse
embryos: development of micromanipulated embryos and proliferation of
single blastomeres *in vitro*. *Biol. Reprod.* 40: 145- 152.
- 106. Willadsen, S.** 1989. Cloning of sheep and cow embryos. *Genome* 31:
956-962.
- 107. Wilmut, I.; Schnicke, A.; McWhir, J.; Kind, A. and Campbell, K.** 1997.
Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:
810-813.
- 108. Williams, T.; Elsdon, R. and Seidel, G.** 1983. Bisecting bovine embryos:
methods, applications and success rates. *Proceedings of the Animal*

Conference on Artificial Insemination and Embryo Transfer in Beef Cattle.
Denver, CO, USA pp. 45-51.

- 109. Williams, T.; Elsdon, R. and Seidel, G. 1984. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. Theriogenology 22(5): 521-531.**
- 110. Willadsen, S. and Godke, R. 1984. A simple procedure for the production of identical sheep twins. Vet. Rec. 114: 240-243.**
- 111. Xiangzhong, Y. and Foote, R. 1987. Production of Identical Twin Rabbits by Micromanipulation of Embryos'. Department of Animal Science Cornell University Ithaca, New York 14853-4801**
- 112. Yong, Z. and Yuqiang, L. 1998. Nuclear-cytoplasmic interaction and development of goat embryos reconstructed by nuclear transplantation: production of goats by serially cloning embryos. *Biol. Reprod.* 58: 266-269.**

ANEXOS

ANEXO 1. SOLUCIONES Y MEDIOS

Solución salina 0,9% para 1L	
NaCl	9gr
Agua destilada	1 L
Gentamicina	1 mL
Medio de manipulación para 100 mL	
TCM-HEPES	90mL
SFB	10 mL
GENTAMICINA	100uL
Medio de maduración para 10 mL	
TCM-199	9mL
SFB	1 mL
PIRUVATO	70uL
FSH-LH	50uL
GLUTAMINA	20 uL
EGF	5 uL
ESTRADIOL	10 uL
GENTAMICINA	10 uL

Nota. Ajustar pH 7.4 con 1N de NaOH

Preparar 250ml de medio base:

Filtrar y luego alícuota.

Medio de capacitación para 50 mL	
TALP-SPERM	50mL
PIRUVATO	900 uL
GENTAMICINA	50uL
BSA fracción V	300mg

Nota. Ajustar pH 7,4 con 1N de NaOH

Preparar 250 mL de medio base:

Para ello preparar inicialmente 200 mL y ajustar pH a 7,2. Ajustar volumen a 250 mL y filtrar. Almacenar hasta dos meses a 4°C.

Alicuotar en tubos de 50 mL.

Percoll al 90% para 40 mL	
SP-TL 10X	4 mL
NaHCO ₃	34mg
LACTATO DE Na	90 uL
PERCOLL	56mL
MgCl ₂ 6H ₂ O	158 uL
CaCl ₂ H ₂ O	78uL

TALP-10X

Se prepara con la misma receta del TALP – SPERM para 100 mL, pero en 10 mL de agua, se fracciona y se conserva a -20°C.

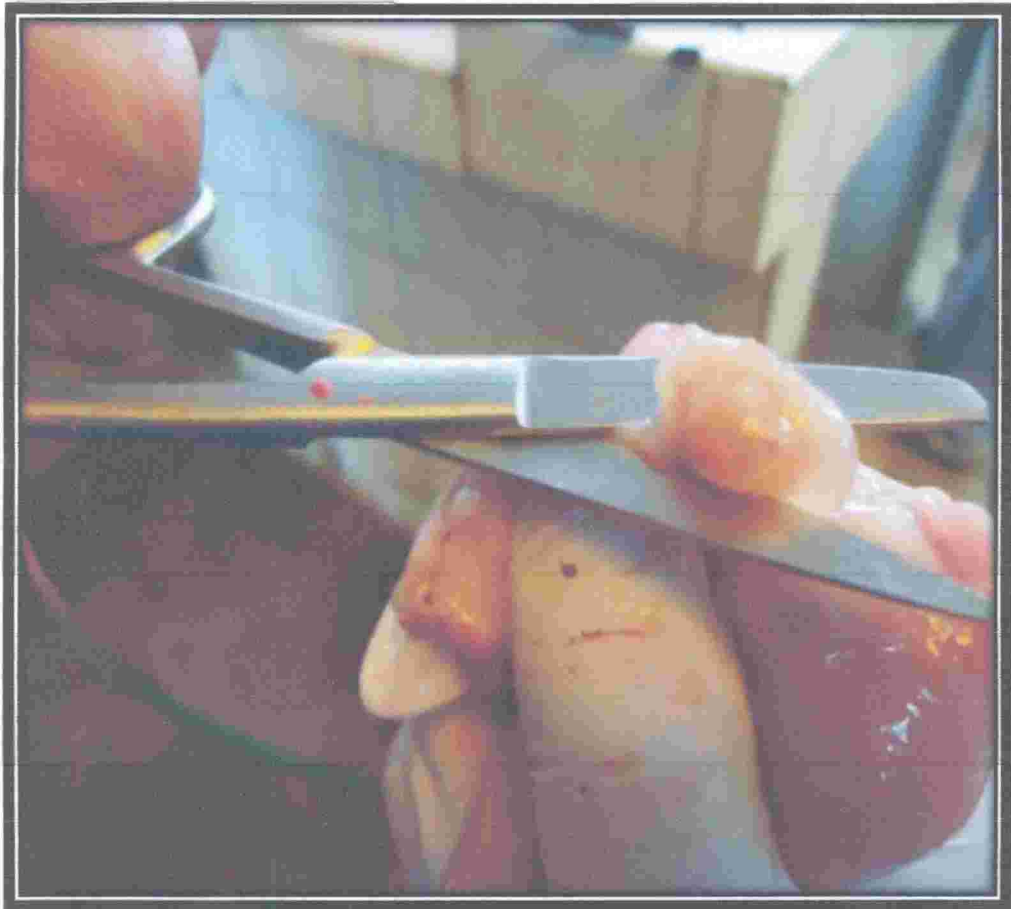
Medio de fertilización para 10 mL	
TALP-FIV	10mL
PIRUVATO	100 uL
HEPARINA	100 uL
GENTAMICINA	10 uL
BSA-FAF	700mg

Nota. Ajustar pH 7,4 con 1N de NaOH

Medio SOF (base)				
Catálogo	Componentes	MW() de W	200 mL	250 mL
S-5886	NaCl	58,44	1258,2 mg (100mM)	2572,75 mg
P-5405	KCl	74,55	106,8 mg (7mM)	133,5 mg
P-5655	KH ₂ PO ₄	136,1	32,4 mg (1,2mM)	30,5mg
C-7902	CaCl ₂ +2H ₂ O	147	49,6mg	62mg
M-2393	MgCl ₂ +6H ₂ O	203,31	19,2 mg	24 mg
S-5761	NaHCO ₃	84,01	421,2 mg	626,5 mg
P-5530	ROJOFENOL	--	0.28mg	0,35mg
L-7900	LACTATO DE Na	1,3 g/ml	94,12 uL (60%)	117,65uL

Nota. Filtrar y almacenar a 4°C hasta añadir aditivos (3 tubos de 50 mL)

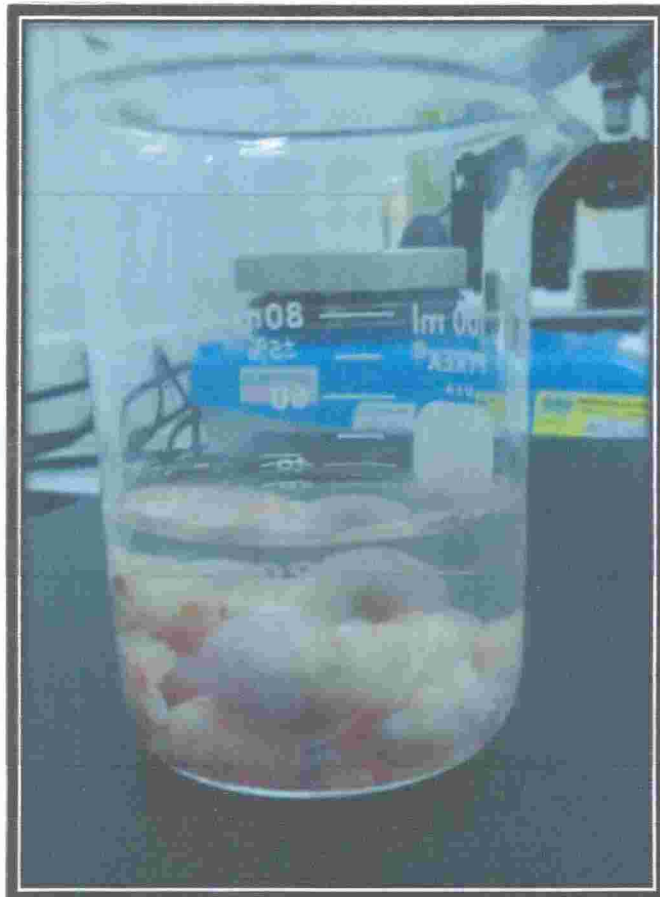
ANEXO 2. Extracción de ovarios de alpaca



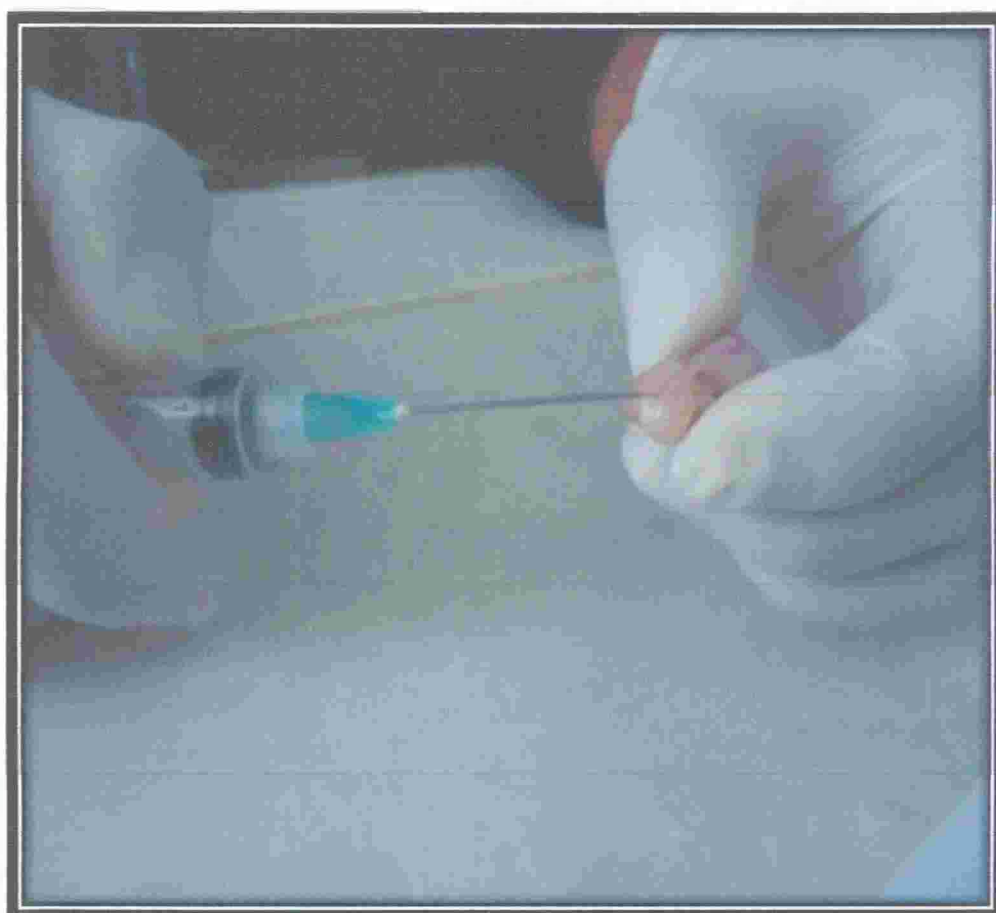
ANEXO 3. Termos de transporte de ovarios de alpaca



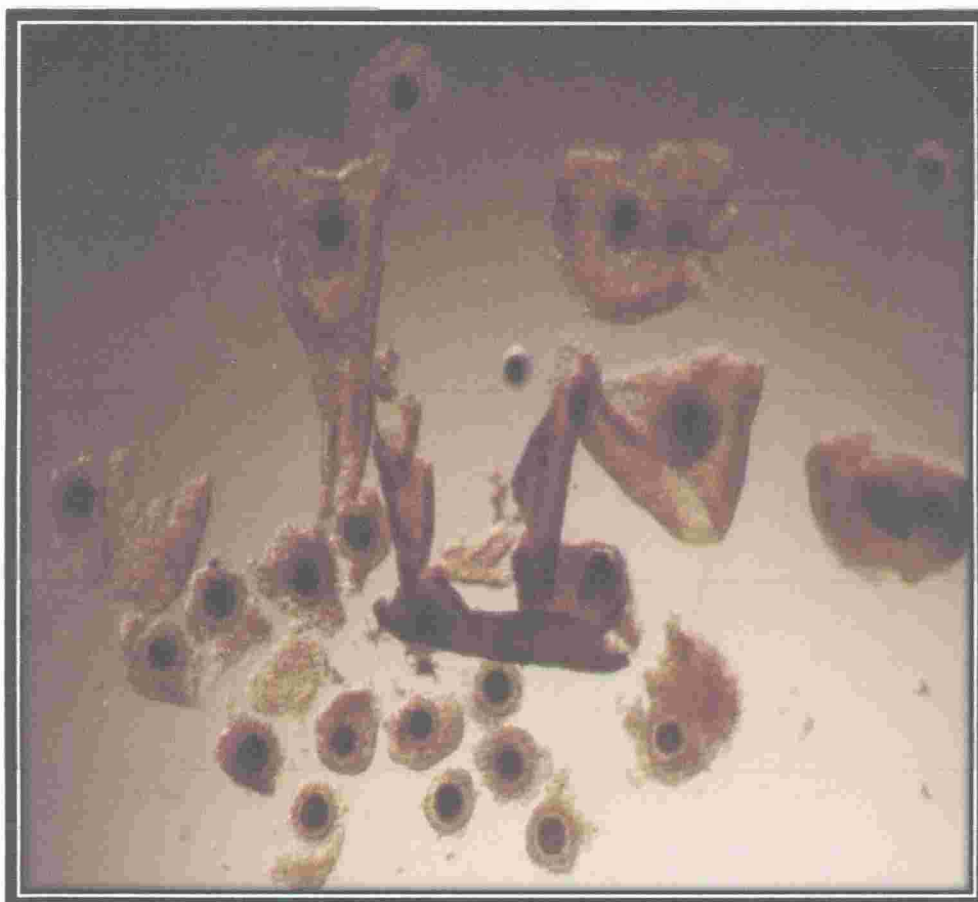
ANEXO 4. Ovarios de alpaca en solución salina



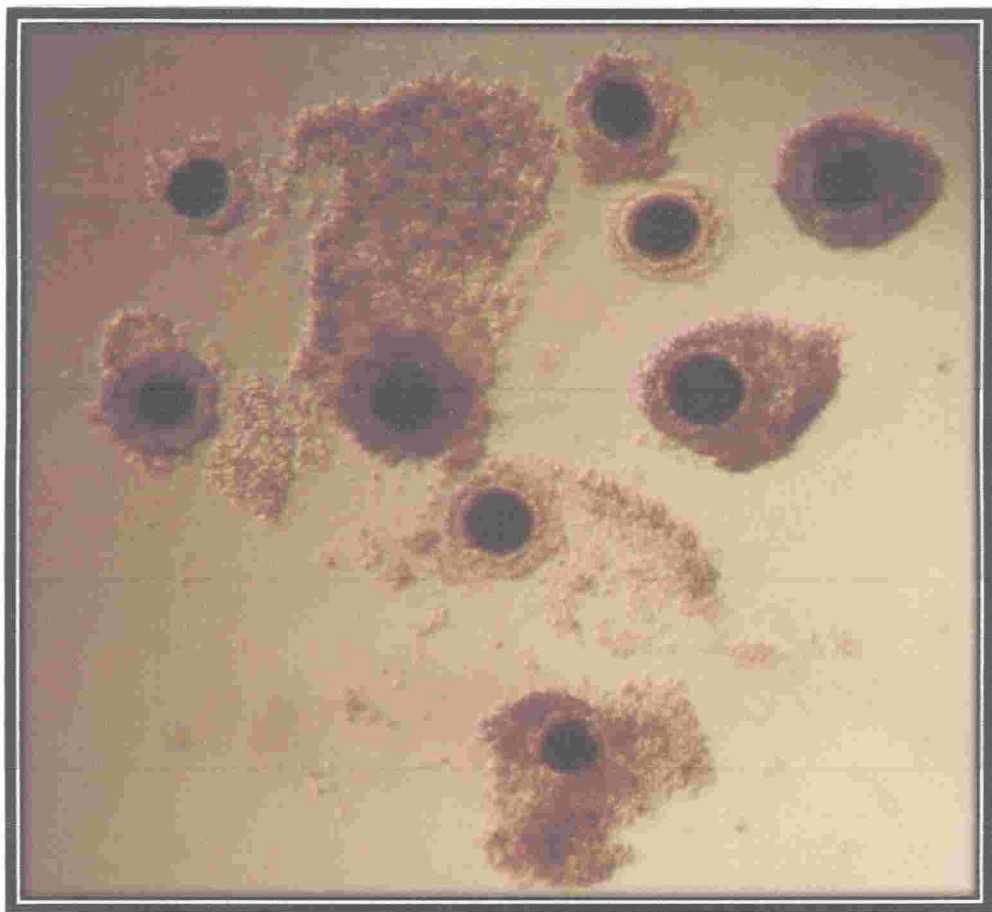
ANEXO 5. Aspiración de folículos de ovarios de alpaca



ANEXO 6. Ovocitos seleccionados para maduración, categorías 1 y 2



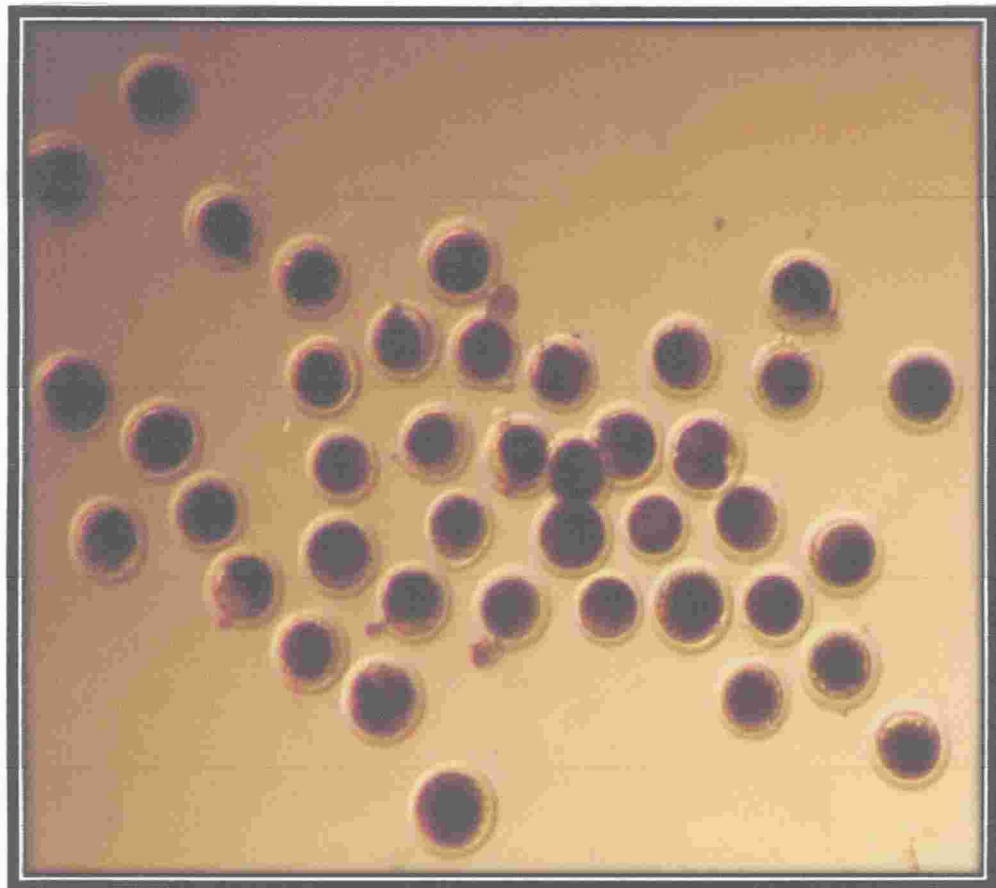
ANEXO 7. Ovocitos maduros luego de 28 horas de maduración



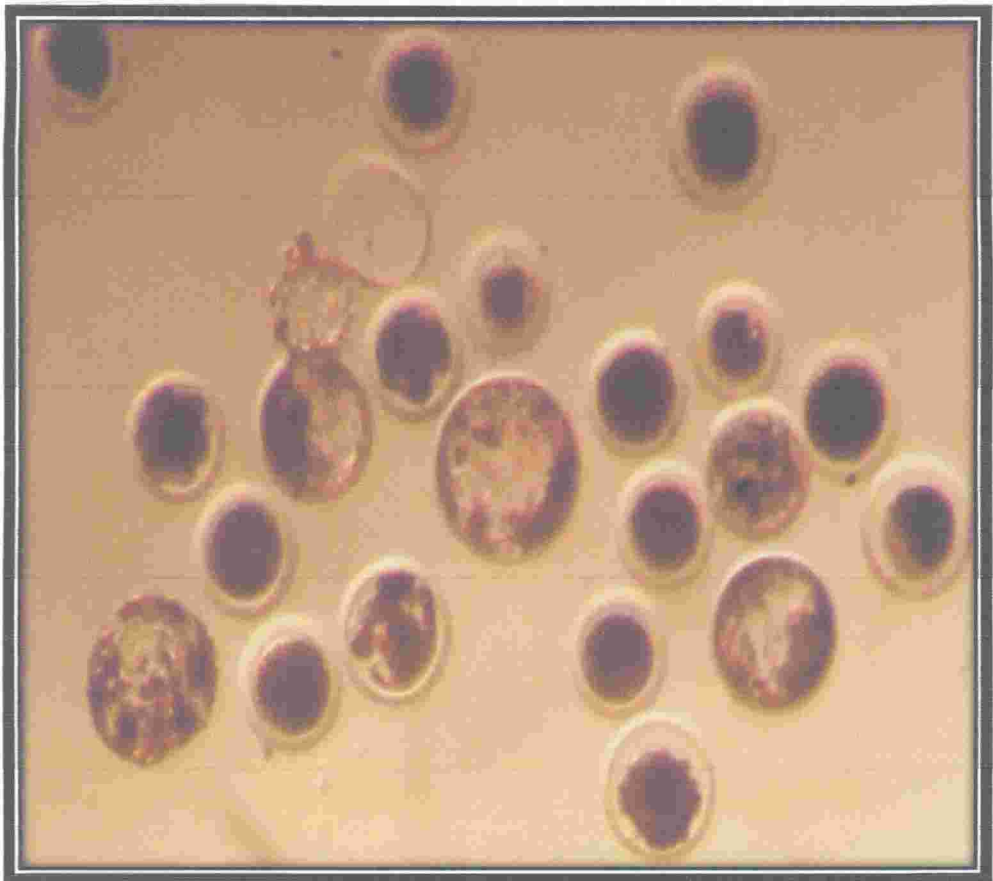
ANEXO 8. Cultivo de cigotos de alpaca en mezcla de gases



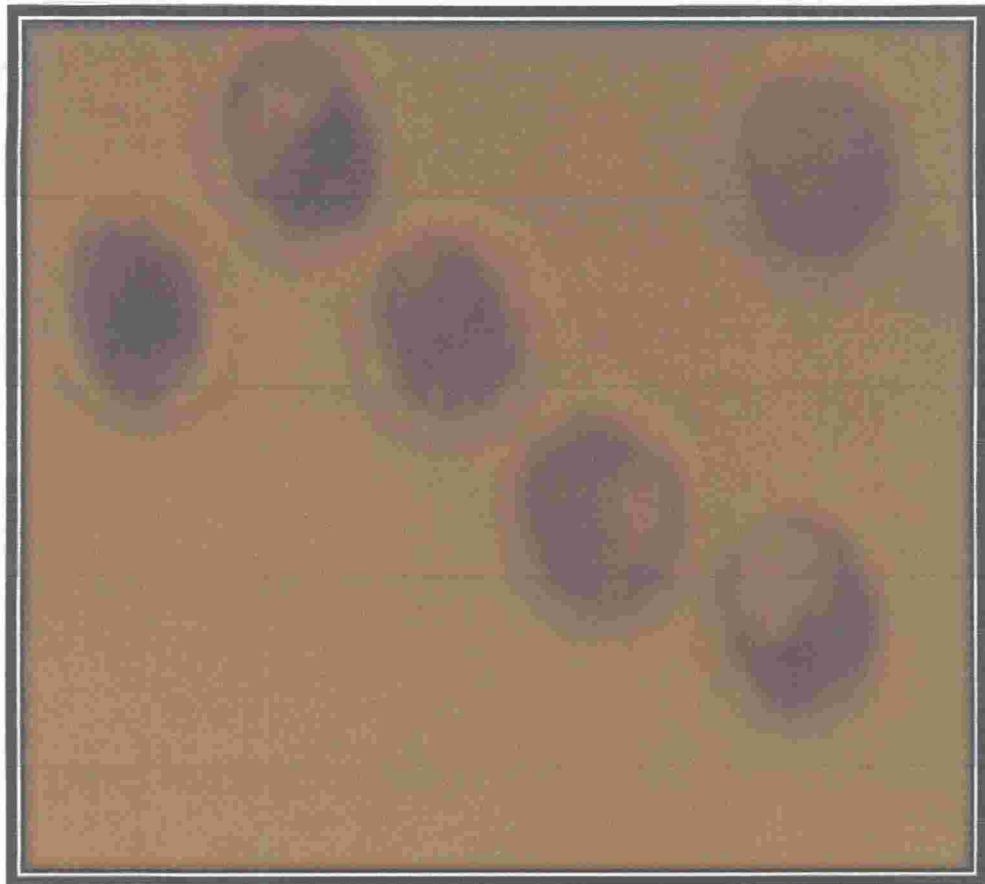
ANEXO 9. Cigotos de alpaca libres de células de cúmulo



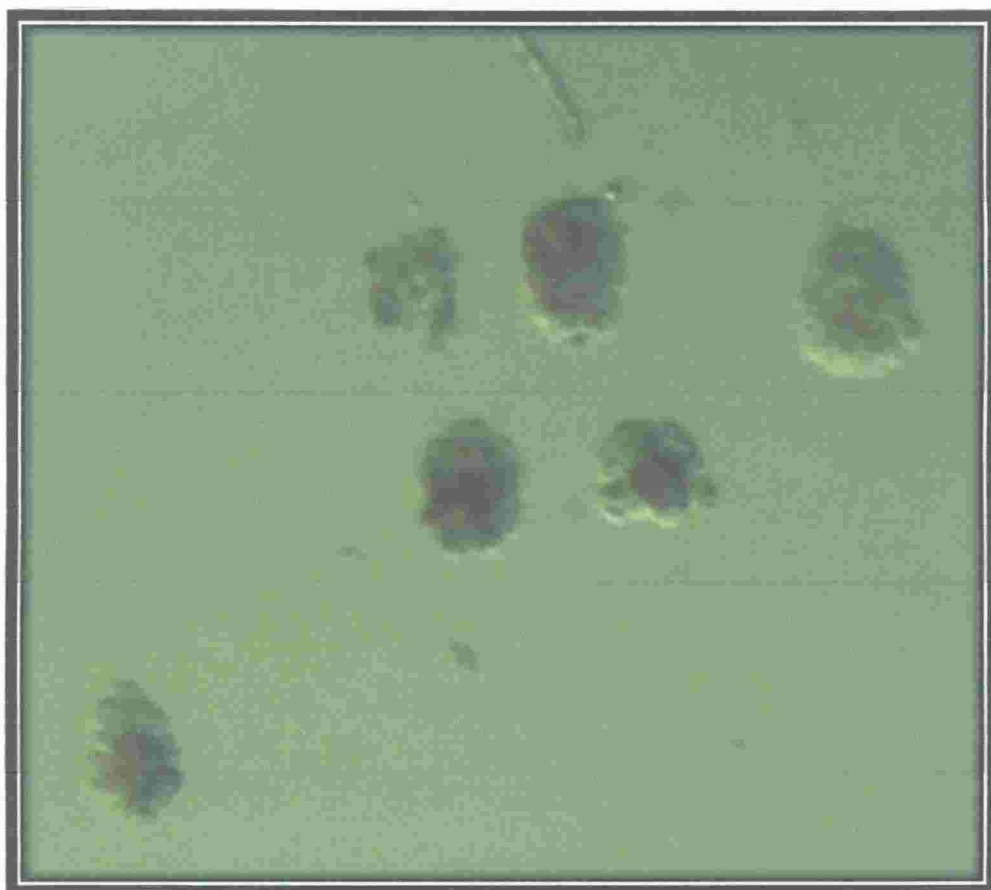
ANEXO 10. Blastocitos de alpaca día 7



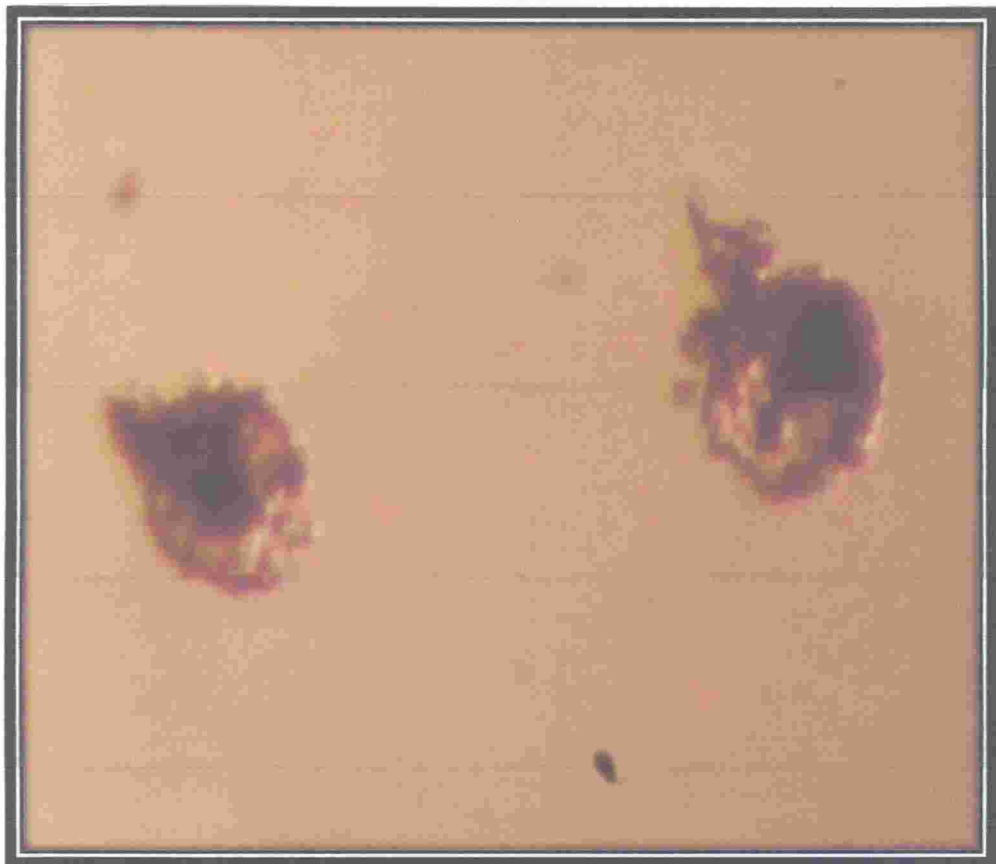
ANEXO 11. Mórulas de alpaca día 6



ANEXO 12. Hemimórulas de alpaca



ANEXO 13. Hemiblastocistos de alpaca



ANEXO 14. Placa con microgotas y microcuchilla para la división de embriones de alpaca



Bipartición de embriones de *Vicugna pacos* “alpaca” producidos *in vitro* en diferentes etapas de desarrollo.

Ayacucho, 2011.

J. Cortez⁽¹⁾, F. Mujica⁽¹⁾, T. Huanca⁽²⁾

⁽¹⁾Universidad Nacional San Cristobal de Huamanga - UNSCH

⁽¹⁾Universidad Nacional San Cristobal de Huamanga - UNSCH

⁽²⁾Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA

RESUMEN

Se realizó el presente trabajo con objetivo de evaluar la bipartición de embriones en diferentes etapas del desarrollo embrionario en *Vicugna pacos* “alpaca”. Para comparar si existe o no independencia entre la técnica de bipartición en estadios de mórula y blastocisto, se utilizaron 284 ovarios de alpacas adultas obtenidas del matadero del distrito de Pilpichaca provincia de Huaytará - Huancavelica. Los resultados obtenidos indican que la tasa de regeneración de los embriones divididos sin la utilización de micromanipuladores a las 24 h de cultivo después de la división fue 64,08% en mórulas y 72,08% en blastocistos, existiendo diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los estadios en estudios. Se utilizó el protocolo de Gabor Vaijta modificado para la producción de los embriones y la manipulación, el medio utilizado para la bipartición de los embriones fue TCM-199 Hepes modificado con 30% de SFB, utilizando una microcuchilla para operaciones oculares (Ophthalmic Knife 15°, ANCON®), cultivando los hemi-embryones sin zona pelúcida durante 24 h en Medio SOFaa con SFB y BSA, en bolsas de cultivo con un ambiente de 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂, durante los días de cultivo. Se logró estandarizar la técnica de bipartición de embriones con instrumentos no convencionales obteniendo clones idénticos con bajos costos de producción, se obtuvieron hemi-embryones transferibles por bipartición sin la necesidad de micromanipuladores a partir de mórulas y de blastocistos, demostrándose así que el en estadio de blastocisto, con la técnica de bipartición, se obtiene mejores tasas de regeneración.

Palabras clave: bipartición, hemi-embryones, mórula, blastocisto.

ABSTRAT

We undertook the present work to evaluate the bipartition of embryos at different stages of embryonic development in *Vicugna pacos* "alpaca". To compare whether there is independence between the bipartition technique in morua and blastocyst stages were used 284 adult alpacas ovaries obtained at the slaughterhouse district Pilpichaca Huaytará Province - Huancavelica. The results indicate that the rate of regeneration of divided embryos without the use of micromanipulators at 24 h of culture after the split was 64,08% and 72,08% in morulae into blastocysts, existing significant difference ($P < 0,05$) between stages studies. A protocol of Gabor Vaijta modified for the production of embryos and handling, the medium used for bipartition of the embryos was modified Hepes TCM-199 with 30% FBS using a microblade for eye operations (Ophthalmic Knife 15 °, Ancon ®), cultivating the hemi-embryos without zona pellucida for 24 h in the Middle sofa with FBS and BSA in culture bags with an atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂, during the days of culture. It was possible to standardize the technique of embryo

bipartition with unconventional instruments obtaining identical clones with low production costs, hemi-embryos were obtained bipartition transferable without the need for micromanipulators from morulae and blastocysts, thus demonstrating that in stage of blastocyst with bipartition technique is obtained best regeneration rates.

Keywords: bipartition, hemi-embryos, morula, blastocyst.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la producción de camélidos sudamericanos cobra gran importancia en el entorno socio-económico en los productores de las regiones alto andinas del Perú, aprovechando de esta manera los subproductos de estas especies como la fibra, carne, pieles y estiércol.

Durante la última década, la investigación y aplicación de nuevas tecnologías relacionadas con la reproducción animal ha evolucionado de manera acelerada, el desarrollo de estas técnicas que incrementan la capacidad reproductiva y permiten el mejoramiento genético de ganado. Las técnicas de manipulación del proceso reproductivo que mayor desarrollo ha tenido son: la superovulación, transferencia de embrionaria, congelación de embriones, cultivo *in vitro* de embriones, partición y clonación de embriones, así como el sexado de embriones y de fetos. La combinación de ellas y su utilización en el ámbito comercial, forma parte de un sistema para la producción y comercialización de mejores animales productores.

Sin duda la aplicación de la biotecnología reproductiva como la bipartición de embriones puede contribuir a superar los bajos índices de fertilidad y aportar al mejoramiento genético en estas especies sobre todo en la multiplicación de animales de alto valor productivo así convirtiéndose en reproductores para los criadores de camélidos sudamericanos en nuestro país.

Actualmente la bipartición de embriones permite la producción de gemelos idénticos al dividir el embrión original por métodos microquirúrgicos. Las evidencias experimentales indican que existe una relación inversa entre el número de secciones que se le hagan al embrión y el porcentaje de éxito. Las tasas de producción de gemelos

monocigóticos van desde poco más de 30% en bovinos y ovinos siendo hasta casi 70% en bovinos, con porcentajes de gestación superiores a 60% e incluso, en algunos casos, equivalentes a 100%.

Establecer la técnica adecuada para la producción de embriones por maduración *in vitro* (MIV), fecundación *in vitro* (FIV) y por consiguiente manipulación de embriones, permitirá al productor alpaquero tener una alternativa en la mejora de su rebaño acortando tiempo y dinero para lograr un rebaño de excelente calidad que le brinde mejores posibilidades de vida.

MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo de investigación, se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología y Reproducción Asistida de la Estación Experimental Agraria Canaán – INIA, ubicado en el distrito de Ayacucho, Provincia de Huamanga, Región Ayacucho, a 2 730 m.s.n.m.

Animales

La muestra se tomó a 142 alpacas de manera no probabilística por las características de las mismas, para cuyo efecto, se consideraron los criterios de oportunidad y cantidad de beneficios. Como unidad de muestra se tomó 284 ovarios de alpaca beneficiadas del Camal Municipal de Pillpichaca

Embriones

Se utilizaron embriones producidos por fecundación *in vitro*, cultivados en medio SOF, seis días para producir mórulas y siete días para producir blastocistos.

Aspiración folicular de ovarios *post mortem* y selección.

Para los cuatro grupos de trabajo se recolectaron aproximadamente 30 ovarios y fueron trasladados al laboratorio en solución salina más antibiótico antimicótico a una temperatura entre 33 y 35 °C. Se aspiraron los folículos entre 3 y 8 mm de diámetro con ayuda de una jeringa de 21G. El líquido folicular se colectó en tubos de 15 ml y se mantuvo a 37 °C hasta el momento de la selección de los ovocitos. Para la colecta se dejó decantar el contenido del líquido folicular y se eliminó la mayor cantidad posible de sobrenadante, el sedimento se mezcló con medio de manipulación (TCM199 con 4 mM de bicarbonato, 18 mM de HEPES, 10% de SFB y 50 µg/ml de gentamicina).

Maduración *in vitro* de ovocitos

Para la maduración se seleccionaron los ovocitos grado I y II que corresponden a aquellos que presentan un citoplasma homogéneo y oscuro y abundantes células del cúmulo (no degenerado). La maduración se realizó en una placa de cuatro pocillos (Nunc, Rochester, NY, USA) (entre 25 y 30 ovocitos por pocillos), durante 30 horas a 38.5 °C y atmósfera de 5% de CO₂ en medio TCM199 suplementado con 0.6 mM de glutamina, 0,2 mM de piruvato, 0,01 U/mL de FSH y LH, 1 µg/mL de estradiol, 50 µg/mL de gentamicina y 10% SFB.

Fecundación *in vitro* de ovocitos de alpaca

Para la fecundación *in vitro* (FIV), se utilizaron los ovocitos maduros *in vitro* (según procedimiento descrito anteriormente). Los ovocitos fueron fecundados a las 30 horas de IVM con espermatozoides de epidídimo de alpacas beneficiadas el día de la recogida de los ovarios, los cuales fueron refrigerados hasta el día de la fecundación cuya motilidad y capacidad fecundante fue chequeada previamente. La capacitación del semen se realizó siguiendo los procedimientos de "swim up" en medio TALP Hepes suplementado con 2 mM de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina y 3,0 mg/mL de BSA (Barile y Col. 1990). Para la fecundación se transfirieron 25 ovocitos maduros a cada

pocillo de una placa de cuatro pocillos y se incubaron con 1 millón de espermatozoides por 1 mL de medio de fecundación (TALP fecundación suplementado con 0,01 mg/mL de heparina, 2 mM de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina y 6 mg/mL de BSA libre de ácidos grasos).

Cultivo de cigotos producidos *in vitro*

Los embriones fueron cultivados en placas de cuatro pocillos en medio SOF, suplementado con 0,4 mM piruvato de sodio, 0,2 mM de L-glutamina, 1X de aminoácidos esenciales y no esenciales, 2% de SFB, 0.1 mg/mL de ácido cítrico, 0,5 mg/mL de mioinositol y 0,3% de Albumina Sérica Bovina (BSA) libre de ácidos grasos. La placa de cultivo se selló en una bolsa hermética la cual se gasificó con una mezcla de aire que contiene 5% CO₂, 5% O₂ y 90% de N₂ artesanal. No se evaluó la división a las 24h para evitar cambios en el pH y temperatura del medio de cultivo.

Evaluación del desarrollo *in vitro* de embriones producidos de alpaca.

Para determinar la capacidad de desarrollo *in vitro* de los embriones de alpaca, se determinó el porcentaje de embriones en estadio de mórula y blastocisto a los 6 y 7 días de cultivo *in vitro*. Los blastocistos fueron clasificados según el grado de desarrollo en: blastocistos expandidos y blastocistos tempranos, características morfológicas (clara definición del macizo celular interno y del trofoblasto) (Gardner y Col., 2000).

Bipartición de los embriones producidos *in vitro* en diferentes etapas del desarrollo embrionario.

La bisección fue realizada en gotas de 50 µl de TCM199-Hepes + 30% de SFB (T30) a 37°C, con una microcuchilla (Ophthalmic Knife 15°, ANCON®), sin la ayuda de un microsujesor. Para esto, los embriones fueron lavados dos veces en el medio de manipulación y luego transferidos a la gota de micromanipulación, la mórula en el día 6 y blastocisto en el día 7. Los embriones fueron seleccionados y divididos despacio bajando la

microcuchilla y luego con cuidado moviéndolo de un lado a otro.

En el caso de blastocisto, la microcuchilla fue orientada en el centro del embrión de modo que el macizo celular interno (ICM) fuera dividida tan uniformemente como sea posible, y luego de ello pasar la mitades en el medio SOF (Fluido del Oviducto Modificado) por 24h. La calidad de los hemiembriones fue evaluada después de las 24 horas de la bisección.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La multiplicación de gametos y embriones, empleando las particularidades haploides o diploides del momento de su desarrollo, constituyen una forma de incrementar la tasa de gestación y así la eficiencia reproductiva para la producción animal, la reproducción asistida en medicina humana y la investigación en todas las especies.

A partir de la década de 1980 se inició en Cambridge (Willadsen, 1989) una nueva fase con el desarrollo de la microcirugía de embriones (MC) con la producción de mellizos idénticos. Esta comprende la micromanipulación de embriones en estadio de mórula o blastocisto, obtenido por lavajes no quirúrgicos, con la división en dos partes iguales (hemi-embryones). Sus particularidades la convierten en una técnica interesante no solamente por aumentar la eficiencia reproductiva de un individuo o factor determinado, sino también por permitir la disponibilidad de animales idénticos en un programa de TE como así también para ser empleados como modelo de investigación (Brem, 1986). La técnica fue rápidamente adoptada y es aplicada actualmente en los programas convencionales de transferencia de embriones (TE) en países con alta disponibilidad tecnológica (Gray, y Col., 1991; Kippax y Col., 1991 y Lange y Col., 1991). Existe sin embargo escasa información sobre la aplicabilidad de esta técnica en países bajo condiciones extensivas de producción y con el empleo de receptoras de razas productoras de carne o sus cruza, cuya rusticidad las hace más adecuadas a esos sistemas de producción que las razas

lecheras, pero cuya capacidad de gestar y criar dos individuos constituye un interrogante (Palma, 2001).

En el presente trabajo de investigación se logró, 64,08% de tasa de regeneración en la división de mórulas y 72,68% en la división de blastocistos, donde estadísticamente existe diferencia significativa en la etapa de manipulación, dando como resultado una eficiente producción de hemiembriones sin la utilización de micromanipuladores y tampoco de micro instrumentos. Sin embargo se han realizado trabajos similares en roedores como lo reportado por Nagashima y Col., (1984) quienes dividieron mórulas compactas luego de un ablandamiento de la zona pelúcida con la ayuda de micromanipuladores, luego de 24 h de cultivo post división obtuvieron 57,3% de blastocistos, 15,3% de eudoblastocistos y 6,9% de pseudoblastocistos Xiangzhong y Col., (1987), dividieron mórulas y blastocistos de conejos con la ayuda de micromanipuladores y los compararon con embriones intactos, obteniendo 77% de implantación con embriones divididos y 78% de implantación con embriones intactos. Por otro lado, Reichelt y Niemann, (1993) dividieron mórulas y blastocistos de cerdos obteniendo como resultado un 66% en tasas de regeneración utilizando micromanipuladores, Morton y Col., (2006) realizaron trabajos en ovejas donde dividieron embriones en estadio de blastocisto y comparados con embriones intactos, mostrando un 33,3 % de implantación con hemiembriones y 80,9% de implantación con embriones intactos, respectivamente. Tao y Col., (1994) reportaron que al dividir embriones en estadios de mórula, blastocisto temprano y blastocisto expandido a las 24 h de cultivo post división se obtiene un 64%, 55,4% y 74,3% de tasas de regeneración post 24 h de cultivo luego de la división, respectivamente. Una técnica comparable aplicada a los embriones de alpaca en el presente trabajo en los estadios de mórula y blastocisto en los días seis, siete y ocho permitió a Gatica y Col., (1984) y Willadsen y Col., (1984)

Tabla 6. Estadios embrionarios de *Vicugna pacos* "alpacas". EEA-CANAAN – INIA – Ayacucho. 2011.

	Nº de Ovarios	Nº Ovocitos Categoría 1 y 2	Nº Ovocitos Fecundados	Nº Ovocitos Cultivados	Nº Mórulas día 6	% Mórulas día 6	TOTAL %
Grupo 01	13	60	60	50	8	16	17,65
Grupo 02	30	100	100	95	16	16,8	
Grupo 03	40	128	128	125	24	19,2	
Grupo 04	55	120	120	118	22	18,6	

Tabla 7. Ovocitos y blastocistos de *Vicugna pacos* "alpacas". EEA-CANAAN – INIA – Ayacucho. 2011.

	Nº Ovarios	Nº Ovocitos	Nº Ovocitos Fecundados	Nº Ovocitos Cultivados	Nº Blastocisto día 7	% Blastocisto día 7	TOTAL %
Grupo 01	40	100	100	98	17	17,34	17,17
Grupo 02	20	70	70	65	11	16,90	
Grupo 03	48	100	100	95	16	16,84	
Grupo 04	38	130	130	127	22	17,60	

Tabla 8. Media y desviación típica de los estadios de mórula y blastocisto. E.E.A. CANAAN

- INIA. Ayacucho, 2011.

Producción de embriones	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Mórula	4	17,6500	1,50000	0,75000
Blastocisto	4	17,1700	0,36313	0,18157

* $p > 0.05$

Tabla 9. Regeneración de embriones de *Vicugna pacos* "alpacas". E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011.

	Nº Ovocitos Cultivados	Nº Mórulas	% Mórulas	Nº Hemi-embryones	Nº Hemi-embryones regenerados	Regeneración %	TOTAL %
Grupo 01	50	8	16	16	10	62,50%	64,08
Grupo 02	95	16	16,8	32	21	65,60%	
Grupo 03	125	24	19,2	48	31	64,58%	
Grupo 04	118	22	18,6	44	28	63,63%	

Tabla 10. Regeneración de embriones de *Vicugna pacos* "alpacas". E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011.

	Nº Ovocitos Cultivados	Nº Blastocistos	% Blastocistos	Nº Hemi-embryones	Nº Hemi-embryones regenerados	Regeneración %	TOTAL %
Grupo 01	98	17	17,34	34	25	73,50%	72,68
Grupo 02	65	11	16,90	22	16	72,70%	
Grupo 03	95	16	16,84	32	23	71,80%	
Grupo 04	127	22	17,60	44	32	72,70%	

Tabla 11. Media y desviación típica de embriones de *Vicugna pacos* "alpacas". E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011.

Bipartición de embriones	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Mórulas	4	64,0775	1,32404	0,66202
Blastocisto	4	72,6750	0,69462	0,34731

* $p < 0,05$

obtener un 94% de corderos nacidos respecto al número de embriones de partida, la bisección de blastocistos en los días 9 y 10 permite obtener corderos con una eficacia elevada en el estadio de blastocisto. Chesne y Col., (1987) obtuvieron un 81% de partos en ovejas, Shoukhrat y Col., (2002) compararon la separación de blastómeros versus la bisección de embriones obteniendo 85% y 95% respectivamente en tasas de regeneración con embriones de *Macacus rhesus*.

En animales mayores se han obtenido resultados similares al presente trabajo, es el caso de Ozil, (1983) quien reporta que al dividir embriones con micromanipuladores en estadio de blastocisto, estas mitades al colocarlas en zonas pelúcidas vacías y luego de la transferencia se obtuvo un 72% de tasas de preñez.

Voelkel y Col., (1984) demostraron que los hemi-embryones provenientes de mórulas y blastocistos no requerían de zona pelúcida para su desarrollo *in vivo*, Gyu Jin Rho y Col., (1998) dividió embriones de vacas con ayuda de micromanipuladores en estadios de mórula y blastocisto producidos *in vitro* donde obtuvo 61% de regeneración en mórulas y 91% de regeneración en blastocisto luego de las 24 h de cultivo. Palma y Col., (1995) realizaron la transferencia de embriones de la raza Aberdeen Angus a receptoras Angus x Criolla, donde obtuvieron 52,9% de partos de los cuales el 77,9% fueron nacimientos simples y 22,2% nacimientos dobles.

El único estudio de bipartición de embriones de bovinos sin la utilización de micromanipuladores fue reportado por Pinter y Col., (1986), obteniendo tasas de regeneración post 24 h de cultivo luego de la división de 68% y 82% en mórulas y blastocistos respectivamente. Estos resultados son semejantes a lo hallado en el presente trabajo de investigación que corresponde a 64,08% y 72,68% en mórulas y blastocistos, respectivamente.

Se obtuvo hemi-embryones con tasas favorables por bipartición sin la utilización de micromanipuladores determinándose que en el estadio de blastocisto se obtienen mejores

tasas de regeneración, obteniéndose un 64,08% y 72,68% de hemi-embryones respectivamente. Existe diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) entre los tratamientos instaurados, es decir, que al dividir embriones en el estadio de blastocisto luego de la manipulación se obtienen mejores tasas de regeneración con respecto al dividirlos en estadio de mórula. En conclusión se logró estandarizar la técnica de bipartición de embriones con instrumentos no convencionales obteniendo clones idénticos con bajos costos de producción así como también se obtuvieron hemi-embryones transferibles por bipartición sin la necesidad de micromanipuladores a partir de mórulas (64,08%) y de blastocistos (72,68%); demostrándose así que en el estadio de blastocisto, con la técnica de bipartición, se obtiene mejores tasas de regeneración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Brem, G.** 1986. Splitting and sexing of bovine embryos. FAO Expert Consultation on Biotechnology for Livestock Production and Health Roma, 6-10 October.
2. **Chesne, P; Colas, G; Cognie, Y; Guerin, C. and Sevellec, C.** 1987. Lamb production using superovulation, embryo bisection, and transfer. *Theriogenology* 27 751-757.
3. **Gardner, D; Lane, M; Spitzer, A. and Batt, P.** 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol. Reprod.* 50:390-400.
4. **Gatica, R; Boland, M; Crosby, T. and Gordon, I.** 1984. Micromanipulation of sheep morulae to produce monozygotic twins. *Theriogenology.* 21:555-560.

5. **Gray, K; Bondioli, K. and Betts, C.** 1991. The commercial application of embryo splitting in beef cattle *Theriogenology* 35, 37-44.
6. **Gyu Jin Rho; Walter, H; Johnson, A; Keith, J and Betteridge, K.** 1998. Cellular composition and viability of demi- and quarter-embryos made from bisected bovine morulae and blastocysts produced in vitro. Departments of Biomedical Sciences, and 2Population Medicine University of Guelph, Guelph, ON, Canada N1G 2W1.
7. **Kippax, I; Christie, W. and Rowan, T.** 1991. Effects of method of splitting, stage of development and presence or absence of zona pellucida on foetal survival in commercial bovine embryo transfer of bisected embryos *Theriogenology* 35, 25-35.
8. **Lange, H; Winke, G. and Brem, G.** 1991. Embryoteilung in der ET-Praxis der Osnabrücker Herdbuchgenossenschaft In: Fortschritte in der Tierzucht G Brem (ed), Ulmer Verlag, Stuttgart, 381-409.
9. **Morton, K; Anthony, M; Rowe, W; Chis, M. and Gareth, E.** 2006. In vitro and in vivo survival of bisected sheep embryos derived from frozen-thawed unsorted, and frozen-thawed sex-sorted and refrozen-thawed ram spermatozoa. Centre for Advanced Technologies in Animal Genetics and Reproduction (ReproGen), Faculty of Veterinary Science, The University of Sydney, NSW 2006, Australia.
10. **Nagashima, H; Matsui, K; Sawasaki, T. and Kano, Y,** 1984. Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morulae. Stock Farm, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Iwama, Ibaraki 319-02, Japan.
11. **Ozil, J.** 1983. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. I.N.R.A., Station centrale de Physiologie animale, 78350 Jouy-en-Josas, France.
12. **Palma, G; Wennigerkind, H; Modi, H. y Brem, G.** 1995. Biotecnologías aplicadas en la reproducción bovina estado actual y aplicaciones futuras. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 15: 159-165.
13. **Palma, G.** 2001. Biotecnología de la reproducción. Ed. INTA. Bariloche-Argentina.
14. **Pinter, Z; Szabad, J. and Petho, A.** 1986. Embryo-splitting without a micromanipulator. 37 The Annual meeting of the European Association for Animal Production, 189.
15. **Reichelt, B. and Niemann, H.** 1994. Generation of identical twin piglets following bisection of embryos at the morula and blastocyst stage. *J. Reprod. Fert.* 100(1): 163-172.
16. **Shoukhrat, M; Mitalipov; Richard, R; Yeoman; Hung-Chih Kuo and Don P. Wolf.** 2002. Monozygotic Twinning in Rhesus Monkeys by Manipulation of In Vitro-Derived Embryos. Oregon Regional Primate Research Center, Oregon Health & Science University, Beaverton, Oregon 97006.
17. **Tao, Y; Cbeng, L; Zhang, M; Li, B; Ding, J; Zhang, Y; Fang, F; Zhang, X. and Maddox-Hyttel, P.** 2008. Ultrastructural changes in goat interspecies and intraspecies reconstructed early embryos. *Zygote.* 16:93-110.
18. **Voelkel, S; Humes, P. and Godke, R.** 1984. Pregnancy rates resulting from non-surgical transfer of micromanipulated bovine embryos. *Proc 10th Int Congr Anim Reprod;* 10:251-253.
19. **Willadsen, S.** 1989. Cloning of sheep and cow embryos. *Genome* 31: 956-962.

20. **Willadsen, S. and Godke, R.** 1984. A simple procedure for the production of identical sheep twins. *Vet. Rec.* 114: 240-243.
21. **Xiangzhong, Y. and Foote, R.** 1987. Production of Identical Twin Rabbits by Micromanipulation of Embryos². Department of Animal Science Cornell University Ithaca, New York 14853-4801

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

RD N° 013-13-FCB-D

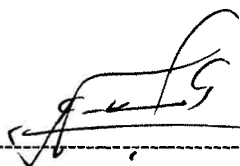
En la ciudad de Ayacucho siendo las cuatro con diez minutos del día veintisiete de Marzo del dos mil trece, en el auditorio de la facultad de ciencias biológicas bajo la presidencia del Mg. Pedro Ayala Gómez (presidente encargado con memorando N° 060-2013), se reunieron los miembros jurados Mg. Pedro Ayala Gómez, Mg. Tomas Yuret Miranda Tomasevich, Mg Fidel Rodolfo Mujica Lengua (asesor), Mg. Gilmar Peña Rojas, actuando como secretaria docente la Mg. Marta Romero Viacava, para recepcionar la sustentación de la tesis titulada "Bipartición de embriones de *Vicugna pacos* "alpaca" producidos *in vitro* en diferentes etapas de desarrollo, Ayacucho 2011 presentado por el bachiller Jenin Víctor Cortez Polanco; con la que pretende optar el título profesional de Biólogo en la especialidad de biotecnología se da inicio al acto de sustentación, el presidente de la comisión evaluadora invito a la secretaria docente a dar lectura de la documentación correspondiente luego del cual dio las pautas básicas al sustentante para que pueda exponer su trabajo de investigación en un tiempo no menor de 45 minutos.

Culminando la exposición del trabajo se dio inicio a la segunda etapa del acto académico en la que el presidente invito a los docentes miembros jurados a iniciar con sus observaciones aclaraciones y las preguntas a fin de ser respondida por el sustentante.

Finalizando esta etapa el presidente de la comisión invito al sustentante y al público asistente a retirarse momentáneamente del auditorio a fin de que los miembros del jurado puedan deliberar en privado la calificación obteniéndose las siguientes calificaciones:

Jurado Calificador	Exposición	Respuestas	Promedio
Mg Pedro Ayala Gómez	17	17	17
Mg Tomas Miranda T.	18	17	18
Mg Fidel Mujica lengua	17	16	17
Mg Gilmer Peña Rojas	17	16	17
		Promedio	17

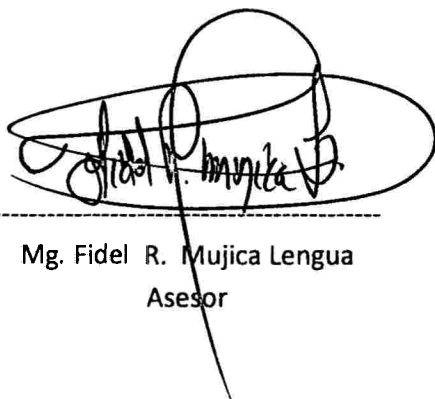
Finalizando la evaluación por parte de los miembros jurados el sustentante obtuvo la calificación promedio final de diecisiete (17) de lo cual dan fe los miembros del jurado calificador estampando sus firmas al pie del presente concluyendo el acto de sustentación siendo las seis y cinco de la noche.



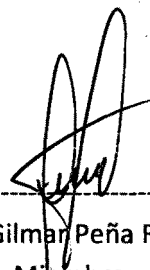
Mg. Pedro Ayala Gómez
Miembro Presidente (e)



Mg. Tomás Y. Miranda
Tomasevich
Miembro



Mg. Fidel R. Mujica Lengua
Asesor



Mg. Gilmar Peña Rojas
Miembro



Mg. Marta Romero Viacava
Secretaria docente