

**VIABILIDAD IN VITRO E IN VIVO DE EMBRIONES DE ALPACA  
CONGELADOS/DESCONGELADOS EN DOS AGENTES CRIOPROTECTORES**

Viability *in vitro* and *in vivo* of frozen/thawed alpaca embryos in two cryoprotectants agents

Paredes A.<sup>1</sup>, Deza H.<sup>2</sup>, Perez UH.<sup>3</sup>, Pérez MG.<sup>1</sup>

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.26>

- <sup>1</sup> Laboratorio de Reproducción Animal, Centro de Investigación y producción de Chuqibambilla, Puno
- <sup>2</sup> Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, UNA, Puno
- <sup>3</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNA-Puno.

E-mail: [guidpe@yahoo.es](mailto:guidpe@yahoo.es)

**RESUMEN**

Los objetivos del presente estudio fueron, evaluar la viabilidad *in vitro* e *in vivo* de embriones de alpacas sometidos a la congelación lenta en dos agentes crioprotectores. Se utilizaron 24 embriones de grado A, recuperados por el método no-quirúrgico al octavo día post coito de donadoras no superestimuladas. Los embriones fueron distribuidos para la adición de dos crioprotectores de la siguiente manera: 12 embriones con etilenglicol a 1.5M y 12 embriones con dimetilsulfóxide a 1.0M en PBS+10% de suero fetal bovino. Los embriones fueron expuestos por 10 min al crioprotector, luego los embriones se cargaron en pajillas de 0.25 mL y se coloraron en un congelador automático de embriones a -7°C por un 1 min, seguidamente se realizó el "seeding", se mantuvieron por 10 min más para su equilibrio y la congelación se realizó con el descenso de la temperatura de 0.5°C/min hasta -33°C y finalmente se almacenaron las pajillas en un termo criogénico con nitrógeno líquido hasta su uso. Para descongelación la pajillas se mantuvieron 8 s a temperatura ambiente, luego se sumergieron en baño María a 32°C/2 min. Se vació el contenido de la pajilla en una placa petri que contenía PBS con 10% de suero fetal+0.2 M de sucrosa para su rehidratación por 5 min. Para la evaluación de la viabilidad *in vitro* se hizo con ayuda de un microscopio estereoscopio, donde mantenían su morfología el 100% (12/12) y 66.7% (8/12) de embriones para etilenglicol y dimetilsulfóxide respectivamente, porcentajes sin diferencia ( $p \geq 0.05$ ). A la evaluación de la viabilidad *in vivo* post transferencia a receptoras se lograron el 58.3%(7/12) y 37.5% (3/8) de preñez a la ecografía para el efecto del etilenglicol y dimetilsulfóxide respectivamente sin diferencia ( $p \geq 0.05$ ). En conclusión los embriones de alpaca en fase de blastocisto se pueden congelar por método lento utilizando los crioprotectores etilenglicol o dimetilsulfóxide.

**Palabras clave:** Alpaca, embriones, congelación, viabilidad.

## ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate the *in vitro* and *in vivo* viability of embryos alpacas subjected to slow freezing viability in two crioprotectants agents. Grade A 24 embryos, recovered by the non-surgical method the eighth day post coitus donor superstimulated not used. Embryos were distributed for adding two cryoprotectants follows: 12 embryos with 1.5 M ethylene glycol and 12 embryos dimethylsulfoxide at 1.0 M in PBS + 10% fetal bovine serum. The embryos were exposed for 10 min to cryoprotectant, then the embryos were loaded into straws of 0.25 mL and they put in an automatic freezer embryos to -7 ° C for 1 min, then held the "seeding", maintained by 10 min more and for equilibrium freezing was done with the decrease in temperature of 0.5 ° C / min to -33 ° C and finally straws were stored in a liquid nitrogen cryogenic heat until use. For thawing the straws remained 8 s room temperature, then immersed in a water bath at 32 ° C / 2 min. The content of the straw in a petri dish containing PBS with 10% fetal calf serum + 0.2M sucrose for 5 min rehydration emptied. For evaluation of the viability *in vitro* it was using a stereoscopic microscope, which maintained their morphology 100% (12/12) and 66.7% (8/12) of embryos for ethylene and dimetilsulfóxide respectively, percentages no difference ( $p \geq 0.05$ ). The assessment of viability after *in vivo* transfer receiving achieved 58.3% (7/12) and 37.5% (3/8) of the ultrasound pregnancy for the effect of ethylene and no difference dimetilsulfoxide respectively ( $p \geq 0.05$ ). In conclusion alpaca embryos in blastocyst stage you can be frozen by slow method using ethylene glycol or dimetilsulfóxide cryoprotectants.

**Keywords:** Alpaca, embryos, freeze, viability.

## INTRODUCCION

La criopreservación de embriones en animales domésticos permite planificar programas de transferencia de embriones a recipientes sincronizando la actividad ovárica o en recipientes con ciclo ovárico natural (Skidmore *et al.*, 2004). Para la criopreservación de embriones se utilizan los agentes crioprotectores tal como el glicerol, dimetilsulfoxide (DMSO), etilenglicol, propanediol, que actúan removiendo el agua intracelular de las células antes de la congelación y evitan la formación de cristales de hielo durante la congelación, que pueden causar daños severos a la célula, pero cuando se adicionan crioprotectores a los medios mejoran la tasa de sobrevivencia de las células durante el proceso de

congelación y descongelación. Sin embargo la tolerancia de los embriones a los diferentes crioprotectores puede variar de acuerdo al estado y especie del embrión (Seidel *et al.*, 1989). Los embriones de camellos recuperados de donadoras superovuladas fueron criopreservados por diferentes métodos, congelación lenta o convencional (Skidmore *et al.*, 1999; 2004), vitrificación (Nowshari *et al.*, 2004; Skidmore *et al.*, 2005; 2009). También los embriones de camélidos (llamas) fueron recuperados de donadoras sometidos a superovulación y sometieron a criopreservación por los diferentes métodos, vitrificación (Aller *et al.*, 2002; Vasquez *et al.*, 2011) y por congelación lenta (Vasquez *et al.*, 2011). Finalmente los embriones criopreservados de camellos y camélidos se evaluaron la viabilidad *in vitro* e *in vivo* con resultados halagadores.

En el presente trabajo el objetivo fue evaluar la viabilidad *in vitro* e *in vivo* de embriones de alpacas sometidos a la congelación lenta en dos agentes crioprotectores

## MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de transferencia de embriones, del Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno, a una altitud de 3974 msnm, cuyas coordenadas son Longitud Oeste 70° 43' 50", Latitud Sur 14° 43' 35".

Se utilizaron 24 blastocistos de grado A recuperados por el método no-quirúrgico al octavo día post coito de donadoras no superestimuladas. Se evaluaron de acuerdo a la clasificación recomendada por Skidmore *et al.*, (2004).

Los embriones fueron distribuidos al azar en dos grupos: G1=12 embriones para la congelación con el crioprotector etilenglicol a 1.5 M y G2 = 12 embriones para la congelación con el crioprotector Dimetilsulfoxido a 1.0 M en PBS+10% de suero fetal de bovino respectivamente.

Para la congelación se siguió el protocolo de Skidmore *et al.*, (2004) realizado en embriones de camellos. Los embriones se expusieron al crioprotector por 10 min, luego los embriones fueron cargados en pajillas de 0.25 mL y colocados directamente dentro una congeladora automática de embriones Marca Biotronics® ltd a -7°C por un 1 min, luego se realizó el "seeding", seguidamente las pajillas se mantuvieron a -7°C por 10 min para su equilibrio. Para la congelación la temperatura se redujo a una tasa de

0.5°C/min hasta -33°C, finalmente las pajillas se introdujeron dentro el tanque criogénico de nitrógeno líquido hasta su uso.

Para la descongelación se extrajeron las pajillas del tanque de nitrógeno y se mantuvieron por 8 s a temperatura ambiente. Luego se sumergieron en baño María a 32°C por 2 min. Seguidamente se vaciaron las pajillas dentro de una placa petri, que contenía PBS+10% de suero fetal bovino más 0.2 M de sucrosa por 5 min para su hidratación. Finalmente se trasladaron a los embriones a otra placa petri que contenía únicamente medio de mantenimiento (PBS+10% de suero fetal bovino).

La evaluación de los embriones descongelados se realizó con la ayuda del estereoscopio Marca Leica® a 200X tomando como referencia la evaluación morfológica en grados establecido por Skidmore et. al. (2004). Las receptoras se prepararon con monta con machos vasectomizados el mismo día que realizaba la monta en las donadoras y la transferencia de embriones se hizo aplicando la técnica recto-vaginal, depositando los embriones en todas las receptoras en el cuerno uterino izquierdo.

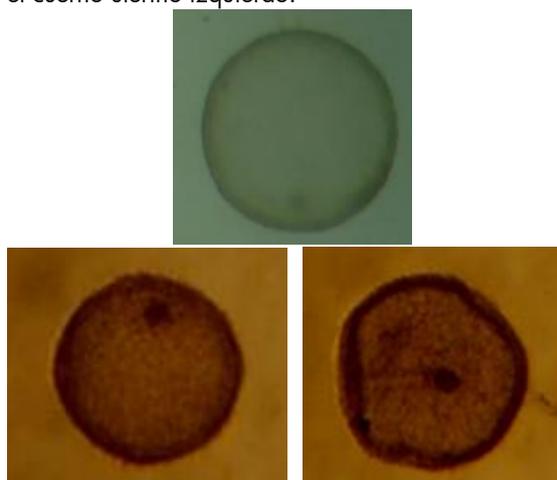


Fig.1. (arriba) Embrión de calidad A, antes de congelación. (Inferior) IZQUIERDA, embrión de calidad A descongelado Y DERECHA, embrión de calidad B, descongelado

El diagnóstico de preñez en las receptoras se realizó por ecografía transrectal a 5 MHz (Sonovet 600V) a los 30 y 60 días post-transferencia. Se consideró embrión con viabilidad *in vivo*, a la verificación de la vesícula embrionaria en la receptora.

Para contrastar los resultados de la viabilidad *in vivo* de los embriones se sometieron los resultados a la prueba de Chi cuadrado con corrección de Yates.

## RESULTADOS

### *Viabilidad in vitro e in vivo de embriones a la descongelación*

Los resultados de viabilidad de embriones (morfología) al proceso de congelación/descongelación, en donde los embriones congelados con etilenglicol mantuvieron su morfología en el 100% (12/12), 9 embriones fueron de grado A y 3 embriones de grado B. Mientras que en los embriones congelados con el crioprotector dimetilsulfóxide mantuvieron su morfología en un 66.7% (8/12), donde 3 embriones fueron de grado A, 5 de grado B y 4 embriones de grado D, no habiendo diferencia estadística entre los porcentajes obtenidos ( $p \geq 0.05$ ).

Tabla 1. Viabilidad *in vivo* de embriones congelados/descongelados y transferidos a receptoras (% de preñez)

OBSERVACIONES	CRIOPROTECTOR	
	Etilenglicol	DMSO
Embriones descongelados y ET	12	8
Receptoras preñadas	7	3
Tasa de preñez (%)	58.3% <sup>a</sup>	37.5% <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>; letras diferentes indica que hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Los resultados de la viabilidad (tasa de preñez) de los embriones descongelados y transferidos a las receptoras fueron del 58.3% para el crioprotector de etilenglicol y 37.5% para el crioprotector dimetilsulfóxide, siendo porcentajes de preñez similares ( $p \geq 0.05$ ).

## DISCUSIONES

Los resultados del presente trabajo del 100% y 66.7% de viabilidad *in vitro* de embriones de alpaca a la post-descongelación que fueron congelados con etilenglicol 1.5 M y 1.0 M con DMSO. Vasquez *et al.* (2011) quienes trabajaron con embriones de llama y reportaron el 57.1%(4/7) de sobrevivencia a la post-descongelación. Resultados que no se pueden contrastar porque diferencias grandes en los métodos de congelación y evaluación que sometieron los autores y como también en el presente estudio.

Respecto a la calidad de los embriones Vasquez *et al.* (2011) congelaron 4 embriones con grado I y 3 embriones de grado II, a la descongelación reportaron, 2 embriones con grado I y 2 embriones

con grado II y 1 con grado III. Mientras que en presente trabajo se lograron, 9 de grado A y 3 de grado B para el crioprotector etilenglicol y 3 de grado A, 5 de grado B y 4 de grado D. para el crioprotector dimetilsulfoxide. Existiendo diferencias en el tipo de evaluación y que la contrastación no sería posible debido a que cada autor toma diferentes características para la evaluación. Pero cabe notar que todo proceso de congelación/descongelación en los embriones de alpaca provoca cambios morfológicos a su evaluación. Los resultados del presente trabajo del 100% de viabilidad *in vitro* en los embriones congelados/descongelados con 1.5 M de etilenglicol coincide con los resultados reportados en embriones de camellos por Skidmore *et al.* (2004) quienes indican que realizaron la evaluación a las 0 h. Resultados que serían soportados por Skidmore *et al.* (2009), quienes indican que la congelación convencional parece preservar mejor la calidad del citoesqueleto que la vitrificación.

Vasquez *et al.* (2011) no reportaron gestación posterior a la transferencia de embriones congelados/descongelados convencionalmente. En camellos Skimore *et al.* (2004) reportaron 25% de gestaciones posterior a la transferencia a recipientes y diagnosticadas a los 18 y 20 días y confirmados a los 27 y 30 días post transferencia. En el presente estudio el diagnostico de gestación se realizó a los 30 días, pero para confirmar la gestación se realizó una segunda detección de gestación a los 60 días donde se observó la desaparición de las gestaciones, especialmente los embriones procedente de la congelación con DMSO y paulatinamente los embriones procedente de la congelación con etilenglicol. Esta pérdida embrionaria en el presente estudio se debería a que las receptoras posterior a la transferencia de embriones fueron llevadas a sus rebaños y alimentadas con pastos naturales de la época que estaban secos y probablemente este factor nutricional podría haber ocasionado una menor funcionalidad del cuerpo lúteo y en consecuencia mortalidad embrionaria temprana como indican que puede suceder (Vasquez *et al.*, 2011).

## CONCLUSION

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación demuestran que los embriones de alpaca en fase de blastocisto se pueden congelar/descongelar exponiendo a los crioprotectores etilenglicol (1.5 M) y DMSO (1.0 M).

## REFERENCIAS

- Aller J, Rebuffi G. Successful transfer of vitrified llama (*Lama glama*)embryos. Anim. Reprod. Sci. 2002; 73: 121-127.
- Nowshari MS, Ali J, Saleem S. Offspring resulting from transfer of cryopreserved embryos in camel (*Camelusdromedarius*). Theriogenology 2005; 63: 2512-2522.
- Seidel GE, Jr, Squires EL, Mekmnon AO, Long PL. Cryopreservation of equine embryos in 1,2-propanediol. Equine Vet. J. Suppl. 1989; 8: 87-88.
- Skidmore JA and Loskutoff NM. Developmental comparence *in vitro* and *in vivo* of cryopreserved expanding blastocysts from the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). Theriogenology 1999; 51: 293 (Abstract).
- Skidmore JA, Billah M, Loskutoff N. Developmental competence *in vitro* and *in vivo* of cryopreserved hatched blastocysts from the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). Reprod. Fertil. Dev. 2004; 16: 605-609.
- Skidmore JA, Billah M, Loskutoff NM. Comparison of two different methods for the vitrification of hatched blastocysts from the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). Reprod. Fertil. Dev. 2005; 17: 523-527.
- Skidmore J, Schoevers E, Stout T. Effect of different methods of cryopreservation on the cytoskeletal integrity of dromedary camel (*Camelus Dromedaries*) Embryos. Anim. Reprod. Sci. 2009; 113: 196-204.
- Vásquez M, Cueva S, Cordero A, Gonzales M., Huanca W. Evaluación de dos métodos de criopreservación de embriones de llamas sobre las tasas de supervivencia "in vivo" e "in vitro". Rev Inv Vet Perú 2011; 22 (3):190-198.