



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



**“EFECTO DE DOS MÉTODOS DE VITRIFICACIÓN DE
EMBRIONES DE ALPACA, SOBRE LA CALIDAD POST DES
VITRIFICACION Y LA TASA DE PREÑEZ POST
TRANSFERENCIA EN LLAMAS”**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. DINA ONOFRE TACA

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

PUNO – PERÚ

2022



DEDICATORIA

A mis padres Enrique Onofre Sanca y Antonia Taca Mayhua, mis hermanos Oscar, Huber y Digran, por su infinito amor y apoyo incondicional hicieron que termine mi carrera.

A mi hermano Élber Onofre Taca. Por ser esa voz de calma, fortaleza y ahora desde el cielo mi ángel protector.

A la Universidad Nacional del Altiplano Puno, que durante el tiempo y desarrollo de mis estudios fue mi segundo hogar.

A los animales que formaron parte en la formación ética y científica durante toda la carrera.

Dina Onofre taca



AGRADECIMIENTOS

Mi eterna gratitud a Dios, por ser el guía y guardián a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos más difíciles y por brindarme una vida de retos, aprendizajes y sobre todo felicidad.

A mi querida Universidad Nacional del Altiplano y a mi Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por permitirme formarme en sus aulas, a mis docentes por brindarme sus conocimientos.

Al Instituto Nacional de Innovación Agraria INIA – Illpa – Puno, anexo Quimsachata, por permitirme desarrollar del presente trabajo de investigación.

Las gracias a mi director de tesis, Dr. Manuel Guido Pérez Duran , por su infatigable apoyo para culminar la presente Tesis, por el entusiasmo puesto y su confianza.

A mi asesor de tesis Dr. Teodosio huanca Mamani (+) y Dr. Jhunion Ccopa Ccallata por su ayuda, dedicación y por brindarme todas las facilidades, guiarme en la elaboración de esta investigación y apoyar en el desarrollo de la misma sin los que no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

A los investigadores del INIA-Puno, Blga. Lariza E. Pahuara Farfan, Dr. Mario Lino Gonzales Castillo, Dr. Oscar Cárdenas Minaya, y a todo el personal del CIP Quimsachata INIA –Puno, quienes compartieron conmigo gratos momentos y me brindaron apoyo cada vez que fue necesario.

Dina Onofre Taca



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

INDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

RESUMEN 11

ABSTRACT..... 12

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 OBJETIVO GENERAL 14

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 14

CAPÍTULO II

REVISION DE LITERATURA

2.1 CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS 16

2.2 ENDOCRINOLOGÍA DEL CAMÉLIDO SUDAMERICANO 16

2.2.1 Desarrollo folicular en alpacas 17

2.2.2 Ovulación..... 18

2.2.3 Formación del cuerpo lúteo 19

2.3 DESARROLLO EMBRIONARIO 20

2.4 RECONOCIMIENTO MATERNAL DE LA PREÑEZ 20

2.4.1 Implantación embrionaria..... 21



2.4.2 Elongación embrionaria.....	22
2.5 CRIO PRESERVACIÓN DE EMBRIONES	23
2.5.1 Tipos de crío preservación.....	24
2.6 CRIOPROTECTORES.....	26
2.6.1 crioprotectores permeables o intracelulares.....	26
2.6.2 Crioprotectores no permeables o extracelulares	27
2.7 CRIOPROTECTORES UTILIZADAS EN LA VITRIFICACIÓN.....	27
2.8 PROCEDIMIENTOS PARA LA CRIO PRESERVACIÓN.....	29
2.8.1 Selección y preparación de embriones	29
2.8.2 Adición de crioprotectores.....	29
2.8.3 Desvitrificación de embriones	30
2.9 TRANSFERENCIA DE EMBRIONES DESVITRIFICADOS.....	30
CAPÍTULO III	
MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 ÁMBITO EXPERIMENTAL	32
3.2 ANIMALES.....	32
3.2.1 Selección de hembras donadoras	32
3.2.2 selección de machos reproductores	32
3.2.3 Selección de hembras receptoras	33
3.3 SINCRONIZACIÓN DE LA ONDA FOLICULAR DE LAS	
DONADORAS Y RECEPTORAS	33
3.3.1 Sincronización de la onda folicular de hembras donadoras	33
3.3.2 Sincronización de la onda folicular de hembras receptoras.....	35
3.3.3 Colecta, evaluación y clasificación de embriones	36



3.4 PROTOCOLO DE VITRIFICACIÓN EMBRIONARIA	39
3.4.1 Protocolo de vitrificación para el tratamiento I.....	39
3.4.2 PROTOCOLO DE VITRIFICACIÓN TRATAMIENTO II.....	43
3.5 DESVITRIFICACIÓN EMBRIONARIA	47
3.6 TRANSFERENCIA DEL EMBRIÓN DESVITRIFICADO	48
3.7 DIAGNÓSTICO DE PREÑEZ.....	49
3.8 MÉTODO ESTADÍSTICO.....	50
CAPÍTULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. EVALUACIÓN DE LOS EMBRIONES RECUPERADOS.....	51
4.2. EVALUACIÓN EMBRIONARIA AL PROCESO DE	
DESVITRIFICACIÓN.....	53
4.3 EVALUACIÓN DE LA TASA DE PREÑEZ	55
V. CONCLUSIONES	59
VI. RECOMENDACIONES.....	60
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	66

ÁREA : Reproducción Animal

TEMA : Métodos de vitrificación de embriones de alpaca y tasa de preñez post transferencia en llamas.

FECHA DE SUSTENTACION: 14 de junio de 2022



INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de calidad embrionaria tomada de Skidmore, (2004).	39
Cuadro 2. Preparación de solución de verificación tratamiento I.....	40
Cuadro 3. Preparación de la solución de desvitrificación con glucosa.....	43
Cuadro 4. Preparación de las soluciones de vitrificación II.	44
Cuadro 5. Preparación de la solución de desvitrificación tratamiento 2	47



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1.	Escala de condición corporal en alpacas. (Cooper, 2008)	33
Figura N°2.	Protocolo de sincronización de hembras donadoras (colectas repetidas).	35
Figura N°3.	Inducción de la ovulación y formación del cuerpo lúteo de las receptoras	36
Figura N°4.	Pajilla cargada con embrión tratamiento I	42
Figura N°5.	Cargado de embrión en pajilla mediante la técnica Open Pulled Straw (OPS).	45
Figura N° 7.	Ecografía de la hembras donadoras.	66
Figura N°8.	Colección de embriones.....	66
Figura N°9.	Busqueda y evaluacion del embrión.	67
Figura N°10.	Preparación de medios de medios de vitrificación	67
Figura N°11.	Vitrificación de embrión (paso de los embriones de la SV1, SV2 y SV3)	67
Figura N°12.	Introducción al N2 L de la pajilla con el embrión	68
Figura N° 13.	Ecografía de las receptoras (presencia de cuerpo lúteo).....	68
Figura N°14.	Evaluacion de los embriones desvitrificados.	68
Figura N°15.	Evaluación ecográfica de las receptoras.	69
Figura N°16.	Diagnostico de preñez de las receptoras a los 21 días.	69



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Calidad y diámetro durante el proceso de colecta repetidas de embriones de alpaca.	51
Tabla 2.	Calidad y diámetro embrionaria después de la desvitrificación	53
Tabla 3.	Tasa de preñez post transferencia de embriones vitrificados en llamas receptoras	55



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

(INIA)	Instituto Nacional de Investigación Agraria
(CS)	Camélidos sudamericanos
(LH)	Hormona Luteinizante.
(GnRH)	Hormona Gonadotropina.
(FSH)	Hormona Folículo Estimulante.
(Pg)	Prostaglandina
(UI)	Unidad Internacional.
(PBS)	Buffer Fosfato Salino.
(IM)	Intramuscular.
(MHZ)	Megahertz.
(mg)	Miligramos.
(mm)	Milímetro.
(NL)	Nitrógeno líquido
(BSA)	Suero albumina bovina
(SF)	Suero fetal
(PEG)	Polietilenglicol
(GL)	Glicerol
(EG)	Etilenglicol
(D-PBS)	Soluciones Salinas tamponadas con sulfato de dulbecco
(SV)	Solución de vitrificación



RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue comparar el efecto de dos métodos de vitrificación de embriones de alpaca sobre la calidad y tasa de preñez en llamas. Treinta embriones en estadio de blastocisto eclosionado fueron recuperados no quirúrgicamente, mediante colectas repetidas, al día 7 post copula del macho, fueron distribuidos en tratamientos T1(n=15) y en el T2(n=15) embriones de grados 1 (excelente). Estos embriones fueron expuestos a solución de vitrificación para T1 (3.4 M de glicerol + 4.6 M etilenglicol). Y para el T2, (20% glicerol + 20% etilenglicol + 0.3 M sucrosa + 0.3 M xilosa + 3% PEG) en tres pasos, y después de ser cargados en pajillas de 0.25 ml fueron sumergidos en (N₂L) a -196°C. Las pajillas fueron retiradas del N₂L y desvitrificadas en baño maría a 36°C por 1 min y fueron colocados en pocillos que contenían soluciones de galactosa y sucrosa 0.5 M y 0.25 M para T1 y T2. Los datos fueron evaluados mediante la prueba de chi-cuadrado con el paquete estadístico SAS 9.4. Se recuperaron embriones frescos de grado 1 (excelente) con diámetro 678.75 μm y 723.14 μm para T1 y T2 respectivamente, posterior al proceso de vitrificación se realizó una segunda evaluación obteniendo embrión de grado II (bueno) con diámetro promedio 667 μm y 887.31 μm para T1 y T2 respectivamente, siendo esta (p>0.05). los cuales fueron transferidos a llamas receptoras sincronizadas, obteniendo una tasa de preñez de 33.33% (5/10) y 20% (3/15) a los 21 días post transferencia embrionaria para T1 y T2 (p>0.05). se observa que los embriones del T1 conservan mayor calidad y diámetro embrionario y por tanto mostraron mejor tasa de preñez que T2.

Palabras claves Alpaca, embrión, vitrificación, transferencia, preñez.



ABSTRACT

The objective of the present study was to compare the effect of two methods of vitrification of alpaca embryos on quality and pregnancy rate in llamas. Thirty embryos in the hatched blastocyst stage were recovered non-surgically, through repeated collections, on day 7 post copulation of the mach, they were distributed in treatments T1 (n=15) and in T2 (n=15) embryos of grade 1 (excellent). These embryos were exposed to a vitrification solution for T1 (3.4 M glycerol + 4.6 M). And for T2, (20% glycerol + 20% ethylene glycol + 0.3 M sucrose + 0.3 M xylose + 3% PEG) in three steps, and after being loaded into 0.25 ml straws they were submerged in (N2L) at -196° c. The straws were devitrified in a water bath at 37 C for 1 min and placed in wells containing 0.5 M and 0.25 M galactose and sucrose solutions for T1 and T2. Data were evaluated using the chi-square test with the SAS 9.4 statistical package. Fresh embryos grade 1 (excellent) with a diameter of 678.75 μ m and 723.14 μ m for T1 and T2, respectively, were recovered. After the vitrification process, a second evaluation was carried out, obtaining a grade II embryo (good) with an average diameter of 667 μ m and 887.31 μ m for T1 and T2 respectively, being this ($p>0.05$). which were transferred to synchronized recipient llamas, obtaining a pregnancy rate of 33.33% (5/10) and 20% (3/15) at 21 days post-embryo transfer for T1 and T2 ($p>0.05$). it is observed that the embryos of T1 conserve greater quality and embryonic diameter and therefore they showed a better pregnancy rate than T2.

Keywords: Alpaca, embryo, vitrification, transfer, pregnancy.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En nuestro país, la crianza de camélidos sudamericanos es la principal actividad económica debido a que gran parte de la población alto andina depende de esta para satisfacer muchas de sus necesidades y es la única fuente de sustento económico para muchas familias, por su utilización como fuente alimenticia de proteína de origen animal y como un recurso para la producción de fibra de buena calidad, pero que en la actualidad se presenta deficientes índices de productividad en la calidad de fibra (Novoa, 1992). Entre otros factores, como las deficiencias en los esquemas de crianza tradicional, como es la crianza conjunta de llamas y alpacas, han ayudado a disminuir la calidad genética de los animales, el interés del uso de las biotecnologías reproductivas, como la crio preservación de embriones, se debe a la mayor posibilidad de selección y mejoramiento genético que podría contribuir en los camélidos sudamericanos y aumentar la eficiencia reproductiva de los animales ayudando de esta forma a desarrollar la producción del sector ganadero, (Dobrinsky, 2002).

El método de vitrificación consiste en un protocolo de enfriamiento muy rápido en la que es menos probable que ocurran daños ya que evita la formación de cristales de hielo intra y extracelulares; además los embriones pueden ser crio preservados en menor tiempo y es en donde busca generar una alta viscosidad y una rápida solidificación de las soluciones de vitrificación (Kaidi et al., 2001).

Desarrollar protocolos de vitrificación para embriones de alpacas, nos permitirá tener una herramienta que adaptando adecuadamente en un programa de mejora genética, contribuiría al mejoramiento y la calidad de las alpacas y otros camélidos sudamericanos.



Sin embargo, se han realizado muy pocos estudios para determinar los efectos de los crio protectores sobre los embriones y la futura viabilidad embrionaria. Por tanto, el presente estudio se realizó con el objetivo comparar el efecto de dos métodos de vitrificación de embriones de alpaca, sobre la calidad post desvitrificado y la tasa de preñez post transferencia en llamas para observar la proporción de los embriones vitrificados y desvitrificados que podrían dar un 50% de preñez.

1.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar el efecto dos métodos de vitrificación de embriones de alpaca, sobre la calidad post desvitrificación y la tasa de preñez post transferencia en llamas.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de 2 métodos de vitrificación sobre la calidad embrionaria a la desvitrificación.
2. Determinar la tasa de preñez post transferencia embrionaria de los embriones desvitrificados por 2 métodos de vitrificación.



CAPÍTULO II

REVISION DE LITERATURA

La vitrificación de embriones de alpacas abre la posibilidad de almacenar material genético de hembras de comprobada calidad genética, y producir crías viables con embrión vitrificado. Además, hay que considerar la limitante que tienen las alpacas hembras de producir menos de seis crías durante toda su vida reproductiva. Sin embargo, se realizaron muy pocos trabajos de crío preservación de embriones en CS (Atabay et al., 2004). La aplicación de la crío preservación en camélidos sudamericanos actualmente se caracteriza por su lento desarrollo es así que Vásquez et al., (2008), evaluaron el efecto de dos métodos de crío preservación sobre la supervivencia in vivo e in vitro de embriones en estadio de blastocisto eclosionado en llamas súper ovuladas, las cuales fueron vitrificadas, a la desvitrificación y transferidas a llamas lograron una preñez de 2/12 para las receptoras. Mientras que Vasquez, (2007), expuso embriones a soluciones de vitrificación, los mismos embriones que fueron descongelados y evaluados. Seguidamente transferidas alpacas receptoras previamente sincronizadas; sin embargo, a la evaluación ecográfica ninguna hembra preño.

Herrid et al., (2016), crío preservó embriones de camellos y al evaluar la tasa de preñez en la que obtuvo 46,1% en camellos dromedarios. Recomienda que también puede ser aplicable la Vitrificación de embriones de otras especies de camélidos incluidos alpaca y llamas. Nathalie et al., (2014), informaron sobre el éxito de un procedimiento de crío preservación de embriones equinos, a fin de conseguir una preñez viable, desvitrifico y estos lo transfirió a una receptora, se logró una preñez viable y el nacimiento de un potro vivo.



2.1 CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Hoy en día se cuenta con cuatro especies de Camélidos Sudamericanos (CS), de los cual dos de ellas son silvestres: guanaco y vicuña y dos domésticas: llama y alpaca. estos se clasifican con los camellos del Viejo Mundo en el orden Artiodáctilo, suborden Tylopoda y la familia Camelidae, subdividida en la tribu Lamini y Camelini. Las cuatro especies de camélidos sudamericanos poseen características en común, como es la presencia de glándulas metatarsianas, labio leporino, tiene una organización social polígama (Wheeler et al., 2006). En el análisis cromosómico de las cuatro especies indica un valor similar para todos $2n=74$ (Marín et al., 2007).

2.2 ENDOCRINOLOGÍA DEL CAMÉLIDO SUDAMERICANO

Los camélidos no presentan un ciclo estral definido como en otra especie, son hembras de ovulación inducida donde posterior a la copula se produce la ovulación, la hormona liberadora de las gonadotropinas, (GnRH) es el neuropéptido quien va controlar las funciones reproductivas, donde la GnRH es secretada por el área de cerebro llamado núcleo arcuato, que está situada en el hipotálamo medio basal, la liberación preovulatoria de la GnRH y el surgimiento preovulatorio de la LH, es inducido por un estímulo somatosensorial genital durante la monta. Su liberación está influenciada por neuronas cuyas terminaciones nerviosas se contactan con el núcleo arcuato. Este recibe factores estimuladores como epinefrina y norepinefrina (Novoa y Leyva, 1996).

La GnRH, que controla la secreción de las hormonas FSH y LH en la adenohipófisis, y son responsables del control de la actividad ovárica. La FSH es la hormona esencial para el inicio del desarrollo y mantenimiento de los folículos ováricos en presencia de LH estimula la secreción de estrógeno por los ovarios, está involucrada en el aumento de la vascularización del folículo dominante. El aumento de la irrigación



permite una mayor obtención de nutrientes bajo la influencia de la FSH, las células de las granulosa se dividen por mitosis incrementando las capas que rodean al ovocito y el aumento LH estimula la producción de testosterona en la teca interna y FSH estimula la aromatización de testosterona a estrógeno en las células granulosa del folículo (Hafez, 1996). La función de la LH es la inducción de la ovulación después de la cual se produce la luteinización de las células del folículo ovulatorio y comienza la secreción de P4, la cual tiene un efecto de retroalimentación negativa en el hipotálamo (Stevenson, 1997).

2.2.1 Desarrollo folicular en alpacas

En los camélidos sudamericanos el desarrollo folicular se da en dos formas, las ondas foliculares son procesos continuos que culminan con la ovulación o la regresión del mismo folículo, las especies domesticas nacen con un número de ovocitos, y gran parte de estas sufrirán atresia y nunca serán ovuladas. A lo largo de toda su vida de una hembra, los folículos primordiales permanecen en un estado de reposo y cada cierto tiempo algunos son seleccionados para poder desarrollarse (Galina y Valencia, 2008).

La onda folicular tiene tres fases o estadios de desarrollo que son descritos como: crecimiento (incremento de diámetro folicular), maduración (cambios mínimos en el diámetro) y regresión (disminuye su diámetro) como indica (Novoa, 1992), En el estadio de maduración el folículo dominante inhibe el desarrollo de los folículos más pequeños, cuando el folículo dominante sufre regresión, un grupo de folículos antrales son reclutados para la emergencia de una nueva onda folicular (Ginther et al., 1989) en los estadios de crecimiento y maduración folicular representa una sucesión de transformaciones sub celulares y moleculares de diversos componentes del folículo: el ovocito, granulosa y teca regidas por varios factores intra-ováricas e intra-foliculares y señales hormonales que dirigen a la secreción de andrógenos y estrógenos.



Estudios de la duración onda folicular (Bravo et al., 1990), reportaron un promedio de duración de 4.8 ± 1.5 días; para el folículo dominante en crecimiento 5.0 ± 1.6 días; para la fase estática o de madurez folicular un promedio 4.0 ± 1.1 días y se reporta entré ondas en total 15 días aproximadamente la duración de la onda folicular como indican (Bravo y Sumar, 1989), muy similar a lo reportado por (Vaughan et al., 2004), quienes indican un intervalo de ondas de 12 días en el 39% y 16 días en el 32% de animales que fueron evaluados mediante la ultrasonografía.

2.2.2 Ovulación

Los camélidos sudamericanos, son las especies que tienen una ovulación inducida, la cual requieren de un estímulo como es la cópula para que suceda la ovulación (San Martín et al., 1968). Sin embargo, hay factores apropiados como los físicos, auditivos, olfatorios o visuales y la copula que inducen a la ovulación. Donde la copula es el estímulo natural más efectivo que induce a la ovulación, usualmente tiene una duración entre 5 a 65 min, la estimulación producida por el coito se inicia con el proceso de la descarga de LH (Novoa y Leyva, 1996). El mecanismo de la ovulación se inicia con la intromisión del pene durante la copula el cual por vía refleja inicia la ovulación este libera la secreción endocrina, es así que las concentraciones de estradiol no varían durante las 18 horas posterior ala copula, tiene a declinar recién a las 22 horas y a las 48 horas después de la copula (Bravo y Sumar, 1989).

Estudios que fueron realizados con la ayuda de ultrasonografías indican que la ovulación, independiente del estímulo, ocurre 30 horas después de la copula en llamas (Huanca et al., 2001), mientras que en alpacas reportan que la ovulación ocurre entre 3 a 4 horas antes que en las llamas la cual es similar a lo observado anteriormente por (Novoa



y Leyva, 1996), quienes reportaron una ocurrencia de ovulación en alpacas a 26 horas post monta en alpacas.

En los camélidos hay un factor de inducción de ovulación la que está dada por la acción del plasma seminal que actúa por la vía sistémica que local, la destrucción de la mucosa endometrial durante la copula es quien permite la absorción del factor de inducción de ovulación (FIO) que está presente en el plasma seminal de los camélidos sudamericanos y que es la que induce a la ovulación (Adams et al., 2005). Las cuales llegan a los centros del hipotálamo e hipófisis. En la cual se produce un incremento de la hormona LH entre los 15 a 40 min después de la copula, llegando a los niveles más altos a las 2 a 3 horas después de la monta (Aba et al., 1995).

2.2.3 Formación del cuerpo lúteo

Luego de la ovulación, continua la formación del cuerpo lúteo (CL) se inicia desarrollándose a los 3 a 4 días después de la ovulación por acción de la LH; comienza la hipertrofia y luteinización de las células de granulosa. seguidamente el tejido de este cuerpo lúteo (CL) las células tecales se luteinizan y dan lugar a las células pequeñas, y al mismo tiempo se produce la hipertrofia y luteinización de las células de la granulosa esto ascendiendo que se formen las células luteales grandes; ambas células luteales son las encargadas de secretar progesterona Hafez, (1996). A este proceso de formación de cuerpo lúteo es llamado metaestro y es el más corto, las células de la teca generan células luteales pequeñas al luteinizarse, además de la luteinización es un proceso de hipertrofia celular de la granulosa formando las células luteales grandes (Santiani et al., 2005). Tanto las células de la granulosa y las tecas son las responsables de la secreción de la P4; siendo las células de la granulosa más predominantes que las células de la tecas, también estas células están en la formación del sistema vascular que comprende venas y arterias



ováricas y tiene como sistema principal que dará al soporte de crecimiento y diferenciación tisular (Hafez, 2002).

El rol que cumple el CL en alpacas y llamas fue estudiado y los resultados indican que el CL es necesario para el mantenimiento de la preñez durante toda la gestación en todas las especies, clasificándolas como CL-dependientes sobre la dependencia de la progesterona (Leyva y García, 1999).

2.3 DESARROLLO EMBRIONARIO

El desarrollo embrionario en las alpacas, se inicia con la combinación de los pronúcleo femenino y masculino del cigoto de una célula se fusionan durante la singamia, duplica su DNA y continúa la citogénesis, donde en el día 1 post ovulación el embrión se encuentra en un estado de una célula, y sigue el día 2 que se halla con 2 a 4 células, día 3 con 8 células y en el día 4 se presenta un estado de mórula, a partir del día 6 post ovulación los embriones se localizan en el útero, y es así que el día 7 se halla en estado de blastocisto eclosionado (Picha et al., 2013).

2.4 RECONOCIMIENTO MATERNAL DE LA PREÑEZ

El reconocimiento de la preñez en camélidos ocurre entre los 8 a 10 días después de la monta, el establecimiento de la preñez requiere de señales de reconocimiento producidas por el conceptus (embrión/feto y membranas extraembrionarias asociadas), para el mantenimiento de un cuerpo lúteo funcional, la diferenciación y funcionalidad endometrial, y la receptividad del útero durante la implantación del conceptus (Burghardt et al., 2002).

Para que se dé el establecimiento de la preñez se requiere las señales de reconocimiento que son producidas por el conceptus (embrión/feto y las membranas



extraembrionarias asociadas) todo esto para el mantenimiento del cuerpo lúteo funcional, y la misma vez la receptividad del útero durante la implantación del conceptus (Burghardt et al., 2002), el conceptus es quien produce esteroides, prostaglandina, proteínas y posiblemente también otros factores que aún no son identificados y son las que juegan un rol muy importante en el establecimiento y mantenimiento de la preñez, se sabe que en las especies como porcinos, equinos y rumiantes el mecanismo de reconocimiento maternal de la preñez (RMP) han sido bien escritos a diferencia de camélidos sudamericanos que aún no están definidas como ocurre el reconocimiento de la preñez (Bazer et al., 1986).

2.4.1 Implantación embrionaria

El embrión llega al cuerno uterino a los días 5 a 6 días después de la ovulación en estado de blastocisto eclosionado la que comienza a elongarse entre los días 9 y 10 y en el cual se establece un estrecho contacto entre el trofoblasto y el endometrio en el día 12 de preñez (Tibary y Anouassi, 1997), El proceso de implantación es un estado de transición en el proceso de la preñez, durante el cual, el blastocisto se pone en una posición fija e inicia una interrelación fisiológica con el útero, para poder garantizar este proceso, en camélidos es muy necesario la presencia del cuerpo lúteo. (Bravo & Sumar, 1989), se describe los cambios que sufre la interface materno-embriionario durante la preñez temprana en alpacas, donde el proceso del desarrollo embrionario inicial, indica que se pueden observar figuras mitóticas tales como células binucleadas y células poliploides, las cuales aparecen en las fases iniciales de la preñez. En el estudio llevado a cabo por Olivera, (2015) en caso de las células epiteliales uterinas en las que existen características de actividad biosintética en la cual se observan las variaciones en las capas y que dependen de la fase de gestación debido a los cambios hormonales que se da las cuales



están relacionadas con la presencia de citoquinas y factores de crecimiento las que se requieren para una buena implantación.

Las interdigitaciones van en aumento y se profundizan a medida que avanza la gestación, el cual va a facilitar el intercambio de nutrientes entre la madre y el feto como indica Olivera et al., (2003), donde las zonas de contacto entre el trofoblasto y el endometrio presentan una capa altamente glicosilada que jugará un papel importante en el proceso de adhesión, señalan que, en las alpacas, el día 15 el blastocisto se encuentra libre en el lumen uterino, observándose que a los 22 y 26 días de gestación el trofoblasto cubre el área de contacto y adhesión por complejos de interdigitación a la superficie uterina, posteriormente, al día 30 el trofoblasto está rodeado por tejido conectivo extraembrionario, el cual al día 45 ya se encuentra vascularizado, iniciando la formación placentaria y estas modificaciones en la interfase materno-embriónica son características de las fases de aproximación, contacto y adhesión del proceso de la implantación embriónica.

2.4.2 Elongación embriónica

La elongación embriónica o también conocido como la expansión del trofoblasto requieren un área de la placenta en la cual ocurre el intercambio de nutrientes e intercambio materno-fetal el cual es de importancia para la sobrevivencia del conceptous, a medida que se da la elongación a la misma vez también ocurre la degradación de la envoltura de las células del trofoblasto que es el que cubren el disco embriónico (Guillomot, 1995), aun no se conocen bien sobre las señales de iniciación para la ocurrencia de la elongación y para interacción molecular entre el disco embriónico y el tejido extraembrionario que determina el éxito del desarrollo del conceptous durante la elongación, por tanto, hace que sea posible la implantación donde varios tipos de



moléculas son las que podrían estar participando en la elongación del embrión en los camélidos sudamericanos (Leyva, 2000).

2.5 CRIO PRESERVACIÓN DE EMBRIONES

La crio preservación tiene como finalidad mantener a las células en un estado de animación suspendida, deteniendo todos los procesos biológicos, incluso la actividad enzimática intercelular, la respiración celular, su metabolismo, además el crecimiento y multiplicación de la célula, luego lográndose viabilidad después de un corto o largo periodo de tiempo como menciona Tanaka et al., (1997). Para poder lograr todo este procedimiento es muy necesario el uso de las bajas temperaturas, teniendo presente los fenómenos físicos y químicos que involucran en el congelamiento de la célula viva (Palasz et al., 2000).

Indican que el tiempo que pueden permanecer viables los embriones sometidos a la crio preservación es un incierto. Algunos autores plantean que es factible la idea ambiciosa de mantener viables embriones a temperaturas de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en nitrógeno líquido durante 1000 años o más, donde reportaron el nacimiento de bovino proveniente de embriones crio preservados y almacenados durante 28 meses, de conejos durante 7 años, de ovinos durante 13 años y también indican que pueden sufrir daño celular como la apoptosis de embriones (Shamsuddin et al., 1992)

El desarrollo de estudios sobre la crio preservación de embriones ha tenido una evolución lenta, en comparación a la crio preservación de semen y de otras especies, es por ello, que se le atribuye a la gran complejidad de las técnicas también por el costo que involucra. Sin embargo, en los últimos años la investigación a nivel mundial en el área ha ido creciendo significativamente (Vajta, 2000).



2.5.1 Tipos de crio preservación

La crio preservación ha sido clasificado como lentas y rápidos de acuerdo a la velocidad de enfriamiento y la adición de los crio protectores usados para cada uno de crio preservación. Sin embargo, los principios y objetivos de la crioconservación son que se pueden aplicar para ambos casos (Mamalian Critser et al., 1997).

a) Congelación lenta

Es una técnica de la crio preservación, que consiste en un enfriamiento lento donde intenta mantener un balance delicado entre diversos factores tales como la formación de hielo, el daño osmótico, la alteración del cito esqueleto, el efecto tóxico de los crioprotectores, la concentración intracelular de electrolitos, los daños causados por el frío, la fractura de la zona pelúcida, la alteración de organelas intracelulares y el contacto célula-célula (Vajta, 2000).

La congelación lenta tiene la ventaja de poder usar concentraciones bajas de crioprotectores, y controlar la velocidad de enfriamiento de tal forma a medida que descienda la temperatura disminuya la probabilidad de que se pueda producir toxicidad química y también el shock osmótico, pero no tiene la habilidad de poder prevenir la formación de cristales de hielo debido que se utiliza bajas concentraciones de crioprotectores que se utilizan (Arav et al., 2000).

b) Vitrificación.

La vitrificación es proceso físico de solidificación que es utilizado para poder conservar órganos, tejidos y embriones. Donde la característica de



la solución vitrificante tiene crioprotectores en alta concentración donde pasa de una transición de un estado líquido a un estado vítreo sólido sin la formación de cristales de hielo a nivel intracelular, esto se debe al rápido descenso de temperatura que llega hasta -196°C , la viscosidad de la muestra aumenta progresivamente hasta un punto en que las células se inmovilizan. Es de esta manera, que se encuentran en un estado sólido, aunque su estructura molecular sea la de un líquido extremadamente viscoso (Critser et al., 1997). De lo que se trata es de exponer al embrión a las altas concentraciones de solutos permeables dentro de las cuales pueden estar crioprotectores como los azúcares, se lleva a un enfriamiento rápido o ultra rápido. Los crioprotectores son los que eliminan de manera muy rápidamente el agua de las células y de tal manera sumergirla directamente al nitrógeno líquido (Vajta, 2000).

Durante el aumento extremo de la viscosidad que se da, en donde se requiere una velocidad de enfriamiento muy rápidas (superiores a $2500^{\circ}\text{C}/\text{min}$) y también las elevadas concentraciones de crioprotectores (de 5 a 7 M) como mencionan (Vajta, 2000).

Es así que esta técnica no requiere equipos avanzados, ya que puede ser realizado de manera sencilla, se ha aplicado diferentes protocolos para poder disminuir efectos negativos, con el uso de crioprotectores que son menos tóxicos y la combinación de estos crioprotectores la cual disminuya la toxicidad, pero al mismo tiempo manteniendo las propiedades osmóticas y estos crioprotectores son utilizados por etapas que son tres en la mayoría de los protocolos establecidos (Vajta, 2000).



2.6 CRIOPROTECTORES

Los crioprotectores son sustancias de alto y bajo peso molecular las que se clasifican, desde el punto de vista farmacológico, son estos los que permite a la célula sobrevivir al proceso de crio preservación a través de diferentes mecanismos, entre los diferentes crioprotectores, se puede citar a los alcoholes, las aminos, los azucares, las sales inorgánicas y las macromoléculas. A pesar de su variada naturaleza química, todos los crioprotectores son solubles en medios acuosos y comprenden la capacidad de formar puentes de hidrógeno (Kasai, 2002). Los crioprotectores actúan tratando de evitar los daños causados durante la crio preservación, para conseguir este objetivo, estas actúan básicamente sobre 2 aspectos de la congelación:

a) Sobre la formación de cristales de hielo tanto intracelular y extracelular, ya que inicialmente disminuyen la temperatura muy rápidamente en la que forma los núcleos de hielo (de 0 °C a -4/-5 °C), es decir, la formación de cristales de hielo.

b) Sobre la deshidratación de la célula, debido a su elevada osmolaridad. De esta manera la deshidratación también previene la formación de cristales de hielo intracelulares al ser sometidos a la vitrificación (Kasai, 2002).

2.6.1 crioprotectores permeables o intracelulares

Los crioprotectores son sustancias químicas que se caracterizan por que tienen un peso molecular bajo, que son capaces de atravesar la membrana plasmática de forma activa o pasiva. Entre estos se encuentran alcoholes como es el glicerol, etilenglicol, propilenglicol y sorbitol (Shaw et al., 1995). Dimetilsulfóxido (DMSO), 1-2propanodiol, polietilenglicol, etanol entre otros (Miyake et al., 1993), y también las aminos como la acetamida, la betaína, la formamida, la glutamina, la lisina o la taurina. De todos estos



crioprotectores, el etilenglicol es el crio protector más permeable que se usó ampliamente para la conservación de embriones de diferentes especies ya que tiene baja toxicidad y es de bajo peso molecular y estos crioprotectores deshidratan la células ingresando para proteger el citoplasma y tiene la característica de difusión a través de la membrana plasmática (Schneider & Mazur, 1984).

2.6.2 Crioprotectores no permeables o extracelulares

Los crioprotectores denominados no permeables, son compuestos que tiene alto peso molecular que son utilizados junto a crioprotectores permeables. Estas sustancias ejercen su efecto promoviendo una rápida deshidratación celular aumentando el gradiente osmótico y la incorporación por parte de las células permeables. Los más utilizados son los azúcares como la sacarosa, dextrano sorbitol, sucrosa, lactosa, trealosa, rafinosa y otras proteínas de alto peso molecular (Kuleshova et al., 1999). Estos crioprotectores actúan extrayendo el agua libre intracelular utilizando las diferencias de presiones osmóticas sin ingresar a la célula; estas para mantener la normal funcionalidad y estructura de la membrana ya que disminuye actividad del agua; que deshidratan junto a otro crioprotector de las células de los embriones (Sommerfeld y Niemann, 1999).

2.7 CRIOPROTECTORES UTILIZADAS EN LA VITRIFICACIÓN

- **Sacarosa (sucrosa):** La sacarosa, es un azúcar, un disacárido presentan 45 moléculas de átomo y la molécula es $C_{12}H_{22}O_{11}$, formado por alfa glucopiranososa y beta-fructofuranosa. es un disacárido que está formado por alfa glucopiranososa y beta fructofuranosa. La sacarosa es transparente, la presencia del color blanco, es causado por la múltiple difracción de la luz en un grupo de cristales (Shaw et al., 1997).



- **Glucosa:** La glucosa es capaz de actuar como crioprotector, tiene la capacidad de tolerancia a la crio preservación depende un azúcar capaz de actuar como crioprotector, tanto desde el punto de vista metabólico (Amaral et al., 2013).
- **Xilosa:** Crioprotector llamada azúcar que es una aldopentosa, un monosacárido que contiene cinco átomos de carbono y un grupo funcional aldehído. Tiene forma de (hexágono) y la se encuentra ampliamente distribuida en distintas materias vegetales: como madera (cerezo), paja, etc (Sommerfeld & Niemann, 1999).
- **Polietilenglicol (PEG):** El polietilenglicol, más conocido como macro gol, es un poli éter ampliamente empleado en la industria. Esta se produce por la interacción de óxido de etileno con agua, etilenglicol u oligómeros de etilenglicol. La reacción está catalizada por ácidos o bases. Se trata de un polímero que es soluble en agua de elevado peso molecular que son capas de formar puentes de hidrógeno con 100 moléculas de agua por cada molécula de polietilenglicol esta sustancia se encuentra dentro de los crioprotectores permeable (Liebermann et al., 2992).
- **Etilenglicol (EG):** El etilenglicol es un crioprotector una sustancia liquida que absorbe agua, no tiene olor pero tiene un sabor dulce que ha sido utilizado universalmente en la congelación de tejidos y embriones de muchas especies, ya que se considera el menos toxico sobre las células expuesta a este crioprotector (Liebermann et al., 2992).



2.8 PROCEDIMIENTOS PARA LA CRIO PRESERVACIÓN

Se han realizados muchos reportes en almacenamiento de embriones mediante la crío preservación en distintas especies, pero la aplicación del método hasta la actualidad es complicada porque los embriones sufren cambios y daños celulares, aun no se define protocolos de vitrificación ya estandarizadas para camélidos sudamericanos, es por ellos que la tasa de preñez obtenida con embriones transferidos después de ser sometidas a soluciones vitrificantes son menores que con embriones frescos: se reporta que el promedio de tasa de preñez a nivel mundial empleando embriones crío preservados es alrededor del 50%. Sin embargo, se espera que, el procedimiento se haga más simple y aplicable de esta manera la tasa de preñez se incremente y que sea más viables para todas las especies especialmente para camélidos sudamericanos (Tanaka et al., 1997).

2.8.1 Selección y preparación de embriones

Para la crío preservación de los embriones se inician después de la colecta de embriones, la selección y clasificación de los embriones en estadio de blastocisto eclosionado, se realiza de acuerdo a sus características morfológicas que presenta el embrión seleccionado. Posteriormente los embriones son sometidos a varios lavados en medio de mantenimiento, enriquecida con suero fetal bovino. Dichos lavados se realizan con la finalidad de limpiar la superficie de los embriones que podrían tener adheridos moco uterino y a la misma vez protegerlo contra la contaminación bacteriana y de esta manera estarían listo para someter al proceso de vitrificación (Palomino et al., 1987).

2.8.2 Adición de crioprotectores

La adición de los crioprotectores a embriones para ser vitrificados, son las que deshidratan parcialmente a fin de evitar la formación de cristales de hielo que lesione las



estructuras citoplasmáticas (Celestinos & Gatica, 2002). La deshidratación se logra incorporando crioprotectores llamados soluciones de vitrificación. Se reporta varios procedimientos de incorporación de crioprotectores que se basan en el método de adición de crioprotectores en diferentes concentraciones (de menor a mayor concentración). Los embriones que son expuestos a estas soluciones de vitrificación, están muy asociado a la concentración del crioprotector que será adiciona, al método de adición de éstos, la temperatura en la cual son adicionados y controlar el tiempo es muy importante para evitar daños a las células que son sometidas a estos. En la actualidad, no se ha realizado un protocolo establecido para procedimiento de adición de los crioprotectores (Tanaka et al., 1997).

2.8.3 Desvitrificación de embriones

Durante el proceso de desvitrificación de embriones se producen cambios osmóticos es así, como el agua congelada en el medio intracelular cambia de estado (sólido a líquido), las concentraciones de los solutos en el medio extracelular se introducen progresivamente (de mayor a menor concentración) y la célula vuelve a rehidratarse para poder compensar esta diferencia de concentraciones entre el intracelular y extracelular (Palomino & Li, 2000). La desvitrificación debe realizar de manera rápida para impedir el crecimiento y formación de los cristales de hielo desarrollado durante la vitrificación. Las pajillas son retiradas del Nitrógeno líquido y son expuestos durante 10s en el aire luego son sumergidos a baño María a 30-35°C aproximadamente por 20-30s y luego son expuestas en soluciones de desvitrificación (Huanca et al., 2007).

2.9 TRANSFERENCIA DE EMBRIONES DESVITRIFICADOS

La transferencia de embriones es una biotecnología de reproducción asistida basado en la producción de embriones por una hembra donante de alta calidad genética y



características deseables para el productor, donde estos embriones son transferidos a hembras receptoras, para que en estas suceda la implantación en el útero de la receptora y su desarrollo progresivo. Es decir, mediante la técnica del trasplante de embriones se pretende aprovechar el potencial reproductivo de una hembra de alta calidad genética (Palomino, 2000), Al igual que en otras especies domésticas, en la alpaca las técnicas de la transferencia de embriones están siendo bien desarrollada. Es haci que Vasquez, (2008) realiza la transferencia de embriones desvitrificados en llamas en la que obtiene resultados de tasa de preñez.

(Vivanco Mackie, 2018) menciona que es fundamental que las tecnologías reproductivas avancen para el mejoramiento genético animal y que permitan lograr el incremento de la tasa reproductiva de animales selectos, una técnica que se conoce como transferencia embrionaria que los embriones selectos serán insertados en alpacas receptoras lo que permite a su vez una mayor intensidad y precisión de selección y a la más temprana edad posible.



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ÁMBITO EXPERIMENTAL

La investigación se desarrolló en el laboratorio de producción de embriones del Centro de Innovación y Producción (CIP) Quimsachata, del Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA – Puno. Ubicado en el distrito de Santa Lucía y Cabanillas que pertenece a la provincia de Lampa, departamento de Puno, con una extensión de 6,281 ha, a una latitud de 4300 msnm, y dentro las coordenadas a 15°46'00" latitud sur y 70°36'00" longitud oeste de Greenwich; está localizado dentro de la zona agroecológica denominada puna seca (SENAMHI, 2018).

3.2 ANIMALES

3.2.1 Selección de hembras donadoras

Se seleccionaron 20 alpacas hembras vacías de 4 a 5 años de edad, las cuales se encontraban en una condición corporal 3, amplias en el hueso coxal, para realizar la recto palpación y a la evaluación ultrasonográfica mostraron ondas foliculares regulares y sin defectos anatómicos. Las alpacas fueron alimentadas mediante pastoreo extensivo la cual se complementó con el suministro de heno de avena por las tardes.

3.2.2 selección de machos reproductores

Los machos utilizados fueron seleccionados del plantel de reproductores del CIP-QUINSACHATA, 10 alpacas machos adultos de 4 a 6 años de edad.

3.2.3 Selección de hembras receptoras

Se seleccionaron 30 llamas hembras vacías de 3 a 6 años de edad, con una condición corporal 3. Estas receptoras contaron con un registro de haber tenido una cría anterior, las llamas receptoras recibieron las mismas condiciones de manejo, ausencia de macho y fueron alimentados con pasturas naturales complementadas con el suministro de heno de avena por las tardes.

3.3 SINCRONIZACIÓN DE LA ONDA FOLICULAR DE LAS DONADORAS Y RECEPTORAS

3.3.1 Sincronización de la onda folicular de hembras donadoras

Las alpacas donadoras fueron sometidos a un protocolo de sincronización de la onda folicular, aplicando la metodología descrita por Huanca, (2005).

1. Se inicio realizando la evaluación de la condición corporal de las alpacas donadoras y también de las llamas receptoras, esta evaluación se realizó mediante la palpación en el área de las vértebras lumbares de las alpacas y llamas, teniendo como base anatómica la apófisis espinosa de la columna vertebral, cerca de las últimas costillas (Cooper, 2008), mediante la escala de evaluación 1 a 5.

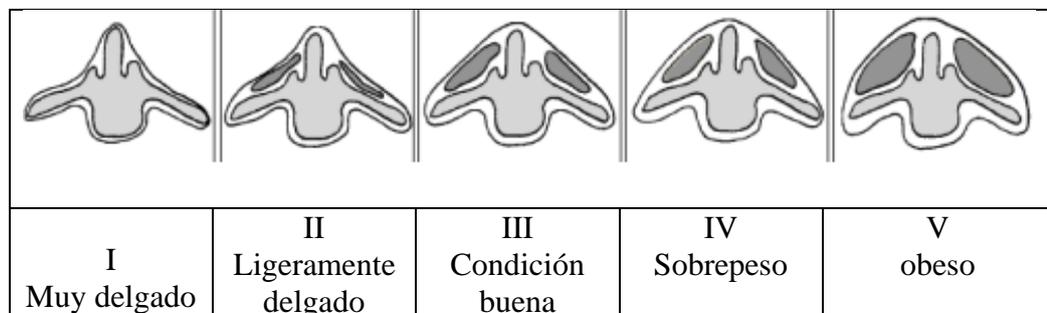


Figura N°1. Escala de condición corporal en alpacas. (Cooper, 2008)



2. Siete días antes del experimento se inició realizando una evaluación ultrasonográfica visualizando la presencia de un folículo en las alpacas donadoras.
3. Seguidamente a las hembras donadoras que presentaron folículo ≥ 7 mm se les aplicó 1ml GnRH (0.0042mg Buserelina Acetato; análogo sintético GnRH, conceptase).
4. El (Día 0) nuevamente se realizó una evaluación ultrasonográfica, donde las alpacas que presentaron cuerpo lúteo se les aplicó una dosis de 1ml prostaglandina (0.2263 mg cloprostenol sódico; análogo sintético de la prostaglandina, lutaprost) para regresionar el cuerpo lúteo y reiniciar una nueva onda folicular.
5. Tres días después (Día 3) se realizó otra evaluación ultrasonográfica para determinar la emergencia de una nueva onda folicular, se seleccionaron aquellas alpacas que presentaron un folículo ≥ 7 mm.
6. Luego estas alpacas seleccionadas fueron sometidos a empadre controlado.
7. Siete días después (Día 10) se volvió a realizar la ultrasonografía para observar la presencia de un cuerpo lúteo y realizar la recuperación del embrión.
8. Finalizando la recuperación del embrión mediante el lavado de uterino se aplicó una dosis de prostaglandina para regresionar el cuerpo lúteo y reiniciar una nueva onda folicular.

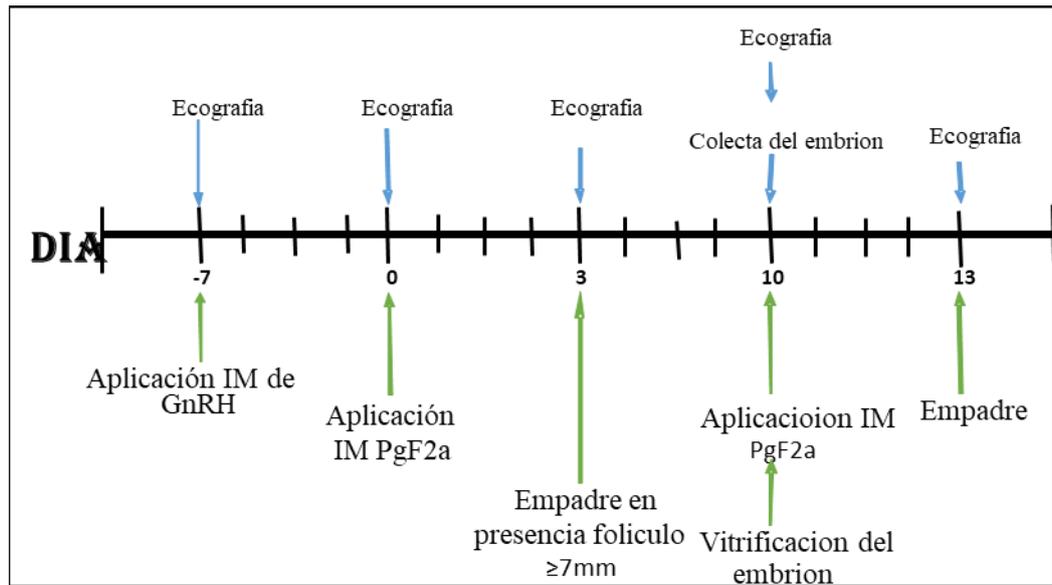


Figura N°2. Protocolo de sincronización de hembras donadoras (colectas repetidas).

Fuente: Huanca, (2005)

3.3.2 Sincronización de la onda folicular de hembras receptoras

Las llamas receptoras fueron sometidos a un protocolo de sincronización de la onda folicular descritos por Huanca, (2005).

1. Se inicio el día 0 realizando la evaluación ultrasonográfica de las receptoras para determinar la presencia de un folículo ≥ 7 mm.
2. Posteriormente las receptoras que presentaron un folículo ≥ 7 mm fueron seleccionadas para la aplicación de una dosis de 1ml de GnRH (0.0042 mg Buserelina acetato) por vía intramuscular, para inducir la ovulación.
3. Luego al día 7 se realizó nuevamente la evaluación ultrasonográfica para determinar la presencia de un cuerpo lúteo.
4. Finalmente, las hembras que presentaban CL fueron considerados aptas para la transferencia de embrión.

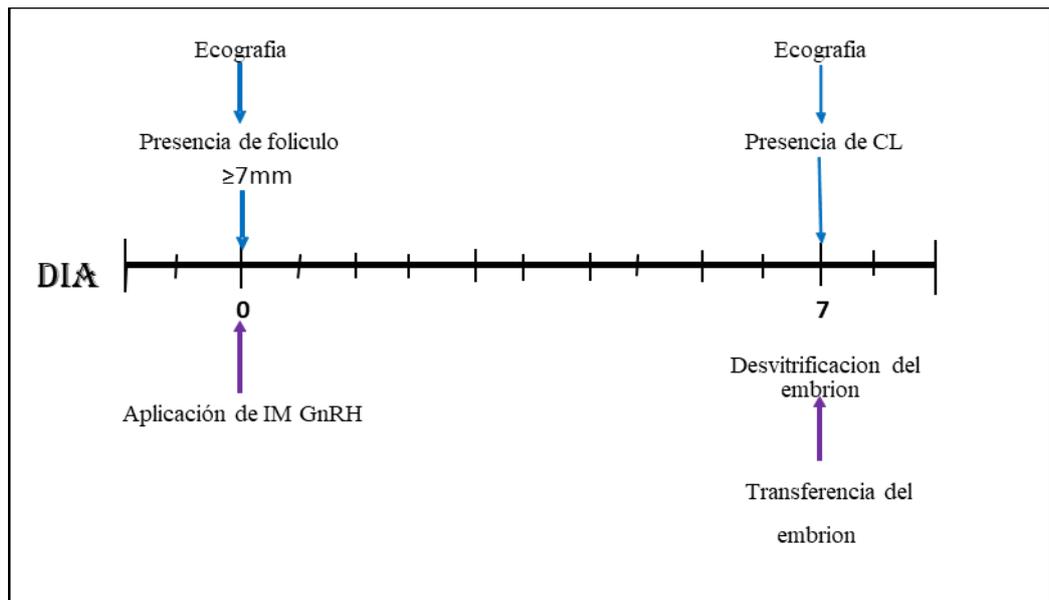


Figura N°3. Inducción de la ovulación y formación del cuerpo lúteo de las receptoras
Fuente: Huanca, (2005)

3.3.3 Colecta, evaluación y clasificación de embriones

a) Colecta de embriones.

La colecta embrionaria de las donadoras, se realizó mediante lavados uterinos por un método no quirúrgico a los 7 días posteriores a la copula del macho descrito por Huanca, (2005).

1. Se inicio con la inmovilización de las alpacas donadoras mediante la sujeción en posición decúbito ventral.
2. Seguidamente se procedió a evacuar las heces del recto y se realizó la limpieza de la región perianal.
3. Luego se realizó la ultrasonografía, encontrando un cuerpo lúteo en uno de los ovarios.



4. Posteriormente se inició con la introducción de una sonda Foley N°14 de doble vía por la vulva.
5. La sonda foley se introdujo en un ángulo de 45° por el vestíbulo separando los labios vulvares en la que se atravesó el cérvix hasta llegar al cuerno uterino, ipsilateral al cuerpo lúteo.
6. Se procedió a insuflar la bombilla con aire, en una jeringa de 20 ml de acuerdo al calibre del cuerno uterino y así fijar al cuerno útero.
7. Por la parte posterior de la sonda Foley se conectó a una sonda “Y”, el medio de lavado PBS y por el otro extremo el filtro EMCOM.
8. El medio de lavado estuvo compuesto por una Buffer Fosfato Salino (PBS) con BSA (2g/L) y gentamicina (160mg/mL), colocadas en baño maría entre 35-37 °C.
9. El lavado se inició incorporando el medio de lavado al cuerno uterino donde fue fijada la sonda Foley, a una cantidad de 30-50 ml, dependiendo del tamaño uterino y se realizó suaves masajes al cuerno uterino mediante recto palpación, el lavado se realizó por tres veces.
10. Culminando el lavado del cuerno uterino, se retiró el aire de la bombilla para luego proceder a retirar la sonda Foley.
11. Seguidamente el medio de lavado más el fluido uterino y embrión obtenido en el filtro EMCOM fue filtrado dejando aproximadamente 20 ml de toda la solución obtenida.
12. Este medio de lavado fue vertida en una placa Petri cuadrículada 100x10, sobre una platina térmica a 36 °C.
13. La búsqueda del embrión se realizó bajo un estereoscopio con platina térmica incorporada a un aumento de 20X.



14. Una vez localizado el embrión se trasladó a una placa Petri multipocillo la cual contenía 500uL de medio de mantenimiento Holding SYNGRO™.
15. Se realizó 3 lavados sucesivos de los embriones obtenidos para su posterior clasificación y evaluación según el criterio mencionado por (Skidmore, 2004). Al mismo tiempo se realizó la medición del diámetro de los embriones con la regla milimétrica del estereoscopio.

b) Evaluación embrionaria

La evaluación embrionaria se realizó con la ayuda de un estereoscopio tomando como referencia su aspecto morfológico en grados establecida por Skidmore, (2004), se procedió a la evaluación de acuerdo a las recomendaciones propuestas por Huanca y Copa, (2019) para este estudio. Asimismo, se realizó una medición del diámetro de los embriones, previo al procedimiento experimental de vitrificación, empleando una escala micrométrica en el objetivo del estereoscopio en un aumento de 20x. En la que se determinaron de las siguientes calidades embrionarias cuadro 01.



Cuadro 1. Clasificación de calidad embrionaria tomada de Skidmore, (2004).

CALIDAD EMBRIONARIA	CARACTERITICAS
GRADO I	❖ Excelente calidad: Es un embrión ideal, esférico, simétrico, con células de tamaño, uniforme.
GRADO II	❖ Buena calidad: Embrión con pequeñas imperfecciones como unas cuantas blastómeras extruidas, formas irregulares.
GRADO III	❖ Regular o media calidad: Embrión con Problemas más definidas, incluyendo la presencia de blastómeras extruidas, vesiculación y de forma más irregular.
GRADO IV	❖ Pobre o colapsado Severos problemas, numerosas blastómeras extruidas, células degeneradas, embrión roto.
GRADO V	❖ Degenerado o embrión no transferible Blastómeras desorganizadas, las células tienen muchas vesículas y gránulos.

3.4 PROTOCOLO DE VITRIFICACIÓN EMBRIONARIA

3.4.1 Protocolo de vitrificación para el tratamiento I

Para el tratamiento 1 se realizó siguiendo el protocolo desarrollado por Herrid et al., (2016).

a) Preparación de la solución del medio de vitrificación tratamiento 1

1. Se inicio midiendo los crioprotectores glicerol y etilenglicol utilizando una pipeta electrónica de 10ml.
2. Las cuales se colocaron en un tubo falcón de 50 ml cada uno de los crioprotectores.
3. Se añadió 10 ml de D-PBS en cada tubo falcón y se disolvió



4. Seguidamente se añadió suero fetal bovino y antibiótico (gentamicina) a cada una de las soluciones
5. Luego toda la solución se ajustó a 30ml con D-PBS
6. Posteriormente se pasó a rotular 3 tubos falcón para las soluciones de vitrificación, fue de la siguiente manera
 - A. SV1: (2.57 ml de glicerol + 2 ml de suero fetal bovino + 1 ml gentamicina)
 - B. SV2: (2.57 ml de glicerol + 5.01 ml etilenglicol + 2 ml de suero fetal bovino + 1ml gentamicina)
 - C. SV3: (6.26 ml glicerol + 6.41 ml etilenglicol + 2ml de suero fetal bovino + 1 ml gentamicina)
7. Después de homogenizar bien las soluciones, se esterilizo con un microfiltro de 0.22 μ m.
8. Cada una de las soluciones de vitrificación se colocó en tubos falco para cada uno respectivamente.
9. Finalmente, los tubos falcón con las soluciones de vitrificación fueron llevados a la refrigeradora para su conservación.

Cuadro 2. Preparación de solución de verificación tratamiento I

S.V.	GL (ml)	EG	D-PBS (ml)
SV1	2.57		30
SV2	2.57	5.01	30
SV3	6.26	6.41	30

SV: solución de vitrificación, GL: glicerol, EG: etilenglicol, D-PBS: medio de mantenimiento.



Fuente: se realizó según descrito por Herrid, (2016)

b) Vitricación de embrión

El embrión que previamente estaba depositado en el medio de mantenimiento se transfirió a las soluciones de vitricación, depositadas en una placa Petri multipocillo a 32°C. Primero, el embrión se transfirió a la solución vitrificante 1 (VS1) durante 5 min, luego se transfirió a la segunda solución de vitricación 2 (VS2) por 5min y finalmente a la solución de vitricación 3 (VS3) durante 45seg.

c) Cargado de la pajilla y sumergido en nitrógeno líquido

Antes de ser colocados en el nitrógeno líquido. fueron colocados en pajillas de 0.25ml (1 embrión/pajilla) de la siguiente manera.

1. Se absorbió una solución de vitricación SV3 40 mm seguido de una columna de aire de 10mm,
2. Seguida del medio de vitricación más el embrión a las que le sigue otra columna de aire y otra de solución de vitricación
3. Finalmente fue sellada con alcohol poli vinilo.
4. La pajilla fue sumergida inmediatamente por el extremo del algodón sumergido durante 10seg.
5. Posteriormente la introducción completa de la pajilla en nitrógeno líquido a -196°C.

6. Fueron reservadas en el tanque de nitrógeno líquido hasta su utilización

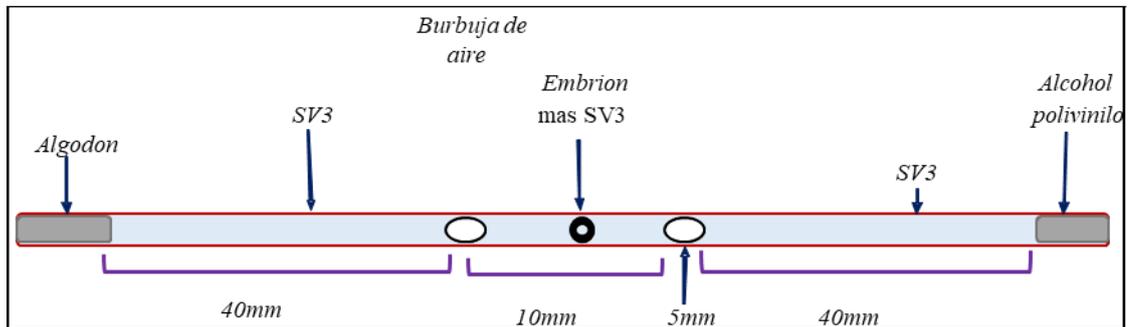


Figura N°4. Pajilla cargada con embrión tratamiento I

d) Preparación de solución de la galactosa para la desvitrificación del embrión

Las soluciones de desvitrificación se prepararon según el protocolo descrito por Herrid, (2016) de la siguiente manera:

1. Se inicio a pesar la galactosa 0.5 M (2.70 g) y galactosa 0.25 M (1.35g), estos se colocaron en tubos falco de 50 ml.
2. Se añadió 20 ml de D-PBS utilizando una micropipeta, para disolver los azucares.
3. Posteriormente se colocó suero fetal bovino para cada una de las soluciones.
4. Se homogenizo colocando él tuvo falco en un Vortex, y finalmente se ajustó a 30 ml con D-PBS.
5. Las soluciones de desvitrificación obtenida, se esterilizo con un microfiltro de 0.22 μ m
6. Se coloco en 3 tubos falcón de la siguiente manera

A. Solución 1: (4ml galactosa (0.5 M) + 1 ml suero fetal bovino)



B. Solución 2: (2ml galactosa (0.25 M) + 2ml D-PBS + 1ml suero fetal bovino)

C. Solución 3: (4ml D-PBS + 1ml suero fetal bovino)

7. Y por último se llevó a la refrigeradora para su conservación

Cuadro 3. Preparación de la solución de desvitrificación con glucosa.

SOLUCION	sol. Stock (ml)	D-PBS	SFB (ml)
S1 0.5M galactosa	4	0	1
S2 0.25M galactosa	2	2	1
S3 D-PBS + 20% SFB	0	4	1

Fuente: Se realizó según descrito por Herrid, (2016).

3.4.2 PROTOCOLO DE VITRIFICACIÓN TRATAMIENTO II

Para este tratamiento 2 se utilizó la metodología descrito por Saito et al., (1994).

a) Preparación de las soluciones de vitrificación

1. Se inicio pesando en una balanza los crioprotectores la sacarosa, xilosa, polietilenglicol.
2. Cada uno de los crioprotectores se colocaron en tubos falcón de 50ml para cada uno.
3. Se añadió 10 ml de D-PBS en cada tuvo falco y se disolvió completamente los azucares
4. Seguidamente se añadió glicerol, etilenglicol y polietilenglicol a cada solución
5. Luego la solución se ajustó a 30ml con D-PBS y se homogenizo todos los crioprotectores



6. Se rotulo cada solución y se esterilizo las soluciones con un microfiltro de 0.22 μm .
7. Fueron colocados en tubos falcón cada una de las soluciones de la siguiente manera.
 - A. SV1: (0.25 ml glicerol + 0.25 g polietilenglicol + 0.85 g sucrosa + 0.37 g xilosa + 2 ml suero fetal bovino + 1 ml gentamicina).
 - B. SV2: (2.5 ml glicerol + 2.5 ml etilenglicol + 0.5 g polietilenglicol + 1.75 g sucrosa + 0.75 g xilosa + 2 ml suero fetal bovino + 1 ml gentamicina).
 - C. SV3: (5 ml glicerol + 5ml etilenglicol + 0.75 g polietilenglicol + 2.56 g sucrosa + 1.12 g xilosa + 2 ml de suero fetal bovino + 1 ml gentamicina).
8. se refrigero para conservar.

Cuadro 4. Preparación de las soluciones de vitrificación II.

S.V.	GL (ml)	EG (ml)	PEG (g)	SUCROS	XILOS	D-PBS (ml)
				A (g)	A (g)	
SV1	0.25		0.25	0.85	0.37	30
SV2	2.5	2.5	0.5	1.75	0.75	30
SV3	5	5	0.75	2.56	1.12	30

SV: Solución de verificación, PEG; Polietilenglicol, GL: Glicerol, EG: Etilenglicol, D-PBS: Medio de mantenimiento.

Fuente: Planteado por Saíto, (1994).

b) Vitrificación de embrión

El embrión se transfirió a la solución de vitrificación, depositadas en una placa Petri multipocillo a 32°C. Primero, el embrión se transfirió a la solución vitrificante 1

(VS1) durante 5 min, luego se transfirió a la segunda solución de vitrificación 2 (VS2) por 5min y finalmente a la solución de vitrificación 3 (VS3) por 1min.

c) Cargado de la pajilla e introducción al N₂ líquido

Se inició colocando en una pajilla 0.25 ml (1 embrión/pajilla)

1. Se inicio rotulando las pajillas de 0.25 ml
2. Seguidamente se aspiró una columna de 3 mm de solución de sucrosa con una solución de PBS 20% separada por una pequeña burbuja de aire y otra columna de 5 mm.
3. seguida de 60mm de sucrosa con PBS 20% se sigue con otra columna de aire seguida con la solución VS3 más el embrión, separada a su vez por otra pequeña burbuja de aire de la solución de vitrificación
4. finalmente se selló con alcohol poli vinílico como se puede observar en la figura 04.
5. E inmediatamente fue sumergido en nitrógeno líquido quedando en contacto directo durante el tiempo de almacenamiento.

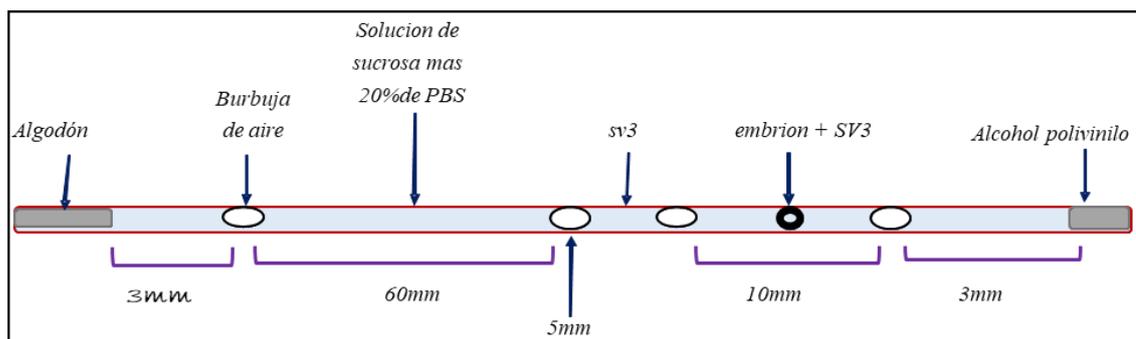


Figura N°5. Cargado de embrión en pajilla mediante la técnica Open Pulled Straw (OPS).



Una vez cargada el embrión en la pajilla de 0,25ml y sellada con alcohol poli vinílico. Se sumergió la pajilla por el extremo del algodón, y fue sostenida en el aire por 10 segundos. Y fueron sumergidas inmediatamente en nitrógeno líquido hasta -196°C .

d) Preparación de la solución para la desvitrificación del embrión

La solución de sucrosa para la desvitrificación que se preparó de la siguiente manera:

1. Se inicio a pesar en la balanza la sucrosa 0.5 M (5.34 g) y sucrosa 0.25 M (2.67g), estos se colocaron en tubos falco de 50 ml.
2. Se añadió 10 ml de D-PBS utilizando una micropipeta, para disolver los azucares.
3. Posteriormente se colocó suero fetal bovino para cada una de las soluciones.
4. Se homogenizo colocando él tuvo falco en un Vortex, y finalmente se ajustó a 30 ml con D-PBS.
5. Cada una de las soluciones se esterilizo con un microfiltro
6. Se coloco en 3 tubos falcón de la siguiente manera
 - a) Solución 1: (4ml sucrosa (0.5 M) + 1 ml suero fetal bovino)
 - b) Solución 2: (2ml sucrosa (0.25 M) + 2ml D-PBS + 1ml suero fetal bovino)
 - c) Solución 3: (4ml D-PBS + 1ml suero fetal bovino)
7. Se refrigero para su conservación

Cuadro 5. Preparación de la solución de desvitrificación tratamiento 2

Solución de desvitrificación	sol. Stock(ml)	D-PBS (ml)	SFB (ml)
0.5M sucrose	4	0	1
0.25M sucrose	2	2	1
D-PBS + 20% SFB	0	4	1

D-PBS: solución de mantenimiento, **SFB:** Suero fetal bovino

Fuente: Indicado por Saíto, (1995).

3.5 DESVITRIFICACIÓN EMBRIONARIA

1. La pajilla fue retirada del nitrógeno líquido y se mantuvo en el medio ambiente por 10 s.
2. Luego se llevó al baño María a una temperatura de 36 °C durante 20 s.
3. Seguidamente se extrajo la pajilla del agua y se procedió a cortar por el extremo sellada con el alcohol polivinilo.
4. Se colocó en la superficie de la placa Petri para verter su contenido (SV3 + embrión) respectivamente para el T1 Y T2 respectivamente.
5. Posteriormente se procedió a la búsqueda del embrión, con la ayuda de un estereoscopio a 20x, removiendo la solución con sumo cuidado.
6. Una vez ubicado el embrión se extrajo del pocillo para su desvitrificación para T1 se colocó en la solución de galactosa 0.5M por 1 min.
7. Seguidamente se transfirió a la solución de galactosa 0.25M durante 5 min pasado este tiempo se pasó a un pocillo con una solución de D-PBS + 1 suero fetal bovino, en el cual se mantienen por otros cinco minutos.



8. Para el T2 de igual manera se procedió a retirar la pajilla que contenía el embrión del tanque de N₂ líquido se colocó a un agua temperada a 36°C por 10 s.
9. El embrión recuperado se colocó a la solución de 0.5 M de sucrosa durante 1 min, pasado este tiempo se procedió a transferir el embrión a 0.25 M sucrosa por 5 y por último a una solución de mantenimiento D-PBS 2ml + 1ml de suero fetal bovino, en el cual se mantuvieron por otros cinco minutos.
10. Al final de este procedimiento se realizó la evaluación embrionaria según skidmore, (2004) y se midió con una regla milimétrica del estereoscopio.

3.6 TRANSFERENCIA DEL EMBRIÓN DESVITRIFICADO

Se realizó la transferencia de 15 embriones desvitrificados para cada tratamiento respectivamente T1 y T2, a llamas receptoras sincronizadas. Una vez localizado y evaluado los embriones, con una pipeta adosada a una jeringa de tuberculina se retiró de la placa Petri realizando tres lavados sucesivos en el medio de mantenimiento comercial (HOLDING). Se procedió al cargado de la pajilla de 0.25ml de la siguiente manera como se observa en la figura 5.

1. Para el cargado de la pistola de transferencia de embriones, se procedió a colocar la pajilla en el interior.
2. Posteriormente la funda de punta metálica y fijado con la rondana. por último, se procedió a proteger con una camiseta sanitaria.
3. Para la transferencia de embrión, se inmovilizó a las llamas receptoras realizando la sujeción en posición de decúbito ventral.

4. Se procedió a evacuar las heces y limpieza de la región perianal lavando con agua y jabón.
5. Se introdujo la mano por el recto junto al transductor del ecógrafo para obtener medidas del cuerpo lúteo y su ubicación.
6. Se figo el cérvix (vía rectal), se procedió a introducir por vía vaginal el aplicador de transferencia de embrión.
7. Se guio la punta del aplicador, para que pase primero el cérvix, llegando al cuerno uterino ipsilateral del CL.
8. Se vació el embrión, presionando el inyector del aplicador de inseminación de forma lenta.
9. Concluido la transferencia del embrión desvitrificado las receptoras fueron llevadas a sus cabañas.

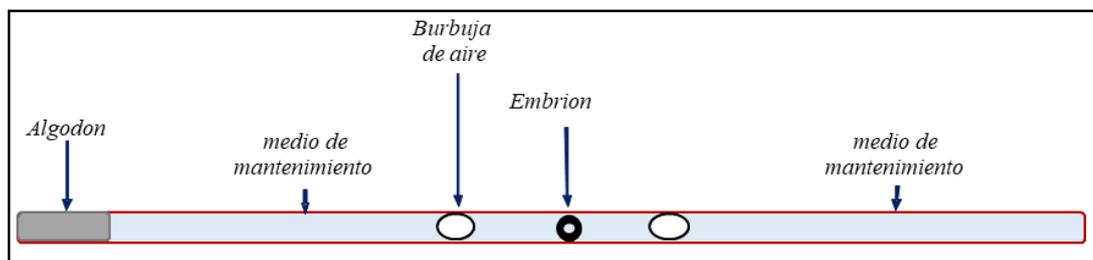


Figura 6. cargado de la pajilla para la transferencia de embrión en el trabajo.

3.7 DIAGNÓSTICO DE PREÑEZ

El diagnóstico de preñez se realizó el día 21 post transferencia embrionaria desvitrificada a cada receptora (llama), se realizó mediante ultrasonografía utilizando un ecógrafo ESAOTE modelo MY LAB ONE con un transductor lineal de 10MHZ de frecuencia, para la confirmación de preñez se observó presencia de la vesícula, botón embrionario y de latido cardiaco.



3.8 MÉTODO ESTADÍSTICO

La posible asociación entre calidad embrionaria a la vitrificación y desvitrificación, Y tasa de preñez, fue analizada mediante la prueba de independencia de Chi-cuadrado cuya fórmula es la siguiente (Navidi, 2006):

$$X^2 = \sum (o_i - e_i)^2 / e_i$$

Donde X^2 es el estadístico Chi-cuadrado, o_i es la frecuencia observada en la i -ésima fila/ j -ésima columna, y e_i es la frecuencia esperada en la i -ésima fila/ j -ésima columna.

El tamaño de los embriones recuperados y desvitrificados se comparó dentro de sus diferentes calidades mediante el DCA.

El diseño empleado es:

$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

X_{ij} = Es la variable respuesta para la j -ésima observación en el i -ésimo tratamiento

μ = Es la media general de la población

α_i = Es el i -ésimo efecto del tratamiento, que es la diferencia entre la media del i -ésimo tratamiento y la media general de la población. ε_{ij} = Es el error experimental.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EVALUACIÓN DE LOS EMBRIONES RECUPERADOS

Tabla 1. Calidad y diámetro durante el proceso de colecta repetidas de embriones de alpaca.

TRATAMIENTO	Nro. Embriones	CARACTERÍSTICA DE EMBRION COLECTADO	
		Calidad	Diámetro (μM)
TRATAMIENTO I	15	Grado I (excelente)	678.75 ± 233.12^a
TRATAMIENTO II	15	Grado I (excelente)	723.14 ± 217.43^a

($p > 0.05$)

En la tabla 1. Se aprecian los embriones recuperados que fueron de grado I (excelentes), con un diámetro promedio de $678.75 \mu\text{m}$ y $723.14 \mu\text{m}$ para T1 y T2 respectivamente, no habiendo una diferencia estadística en diámetro de embriones obtenidos ($P > 0.05$). esto se debería a que las alpacas donadoras fueron sincronizadas mediante el protocolo de colectas repetidas respectivamente para ambos tratamientos.

Al respecto los resultados de Vázquez et al., (2008), quienes colectaron embriones de llama obtuvieron $336.9 \pm 35.1 \mu\text{m}$ de diámetro embrionario en embriones de grado I, estos resultados fueron menores en comparación al trabajo realizado en tamaño de diámetro de los embriones recuperados, esto podría deberse que los autores utilizaron un protocolo de Superovulación con 1000 IU de gonadotropina sérica de yegua preñada eCG en las hembras donadoras de embriones, esto podría producir una gran variabilidad de



respuesta de las hembras donadoras, y que la recuperación de embriones fue menor en diámetro, ya que la superovulación aplicada en las hembras donadoras parece influenciar, debido a que probablemente haya cambios hormonales y estructurales en los fluidos foliculares y de los oocitos, y que podría intervenir en la fertilización y desarrollo temprano del embrión como lo menciona por Callensen, (1995).

Mientras que nuestros resultados son inferiores con respecto a lo obtenido por Apaza. (2017), quien reporto una clasificación en diferentes diámetros embrionarios, embriones $\leq 1000 \mu\text{m}$, embriones entre $>1000 \mu\text{m}$ y $\leq 2000 \mu\text{m}$, embriones $>3000 \mu\text{m}$ respectivamente de embriones de alpaca con respecto al presente trabajo es superior, posiblemente se deba a que realizo la colecta de embriones a partir de los 8 días post copula, siendo en su mayoría embriones elongados, el cual hace que tenga mayor tamaño de diámetro del embrión que colecto, ya que el estadio del embrión va influir en su calidad y diámetro embrionario

. En tanto que resultados obtenidos son superiores con el trabajo de Casas et al. (2014), quienes reportaron un valor $467.50 \mu\text{m}$ de diámetro de embriones de grado I (excelentes) esto se debería a que el trabajo que realizaron para la colecta de los embriones fueron producto de un protocolo de súper ovulación en llamas con dosis de 650 UI (eCG) y a los 7 días pos copula del macho, por la gran variabilidad de respuestas en los camélidos sudamericanos que podría provocar en las hembras receptoras. Nuestros resultados contrastados son de mayores en diámetro embrionario con respecto al trabajo realizado por Vásquez, (2007), quien reporta 0.12 a 0.7 mm ($120-700 \mu\text{m}$) diámetro los embriones en alpacas, esta diferencia se debería a que fueron sometidos a un tratamiento de súper ovulación y también menciona que en este trabajo se realizó en época no reproductiva para las alpacas estas podrían ser uno de los factores por las cuales obtuvo embriones de

menor diámetro, estaría influenciado por la época reproductiva sobre la eficiencia y comportamiento sexual de la alpaca como menciona (Pollard et al, 1995).

4.2. EVALUACIÓN EMBRIONARIA AL PROCESO DE DESVITRIFICACIÓN

Tabla 2. Calidad y diámetro embrionaria después de la desvitrificación

TRATAMIENTO	CARACTERISTICAS DEL EMBRION DESVITRIFICADO			
	Nro. embriones	Calidad	Diámetro (μM)	Tiempo de desvitrificación (min)
TRATAMIENTO I	15	Grado II (bueno)	667 ± 208.08^a	11 min
TRATAMIENTO II	15	Grado II (bueno)	$887.31\pm 188.54a$	11 min

($p > 0.05$).

En la tabla 2. Se aprecian los resultados de calidad y diámetro embrionario a la desvitrificación para el T1 se observa embrión de grado II con diámetro embrionario $667\pm 208.08 \mu\text{m}$ donde reincorporo los líquidos, lo que hace que el embrión recupere el tamaño y calidad inicial en comparación al T2 que se observa embrión grado II con $887.31\pm 188.54 \mu\text{m}$ donde se aprecia que incluyo más líquido haciendo que el embrión recupere mayor diámetro. Esto se le podría atribuir a la utilización de 2 crioprotectores para la desvitrificación galactosa y sucrosa para T1 y T2. La galactosa es un crioprotector no permeable que protege y estabiliza las membranas celulares para que no se detenga el transporte de agua, evitando que la célula sufra lisis durante la difusión del crioprotector y daño en el trofoblasto en la que fue muy buena que mantuvo una alta presión osmótica en el medio extracelular y amortiguo el daño intracelular evitando la formación de cristales de hielo en las blastómeras en la rehidratación de tal manera que evito el shock



osmótico y la lisis de las blastómeras embrionarias durante la remoción del crioprotector, esto se puede sustentar de acuerdo a estudios realizados por Rall. (1987), muy diferente al T2 en la que se utilizó la sucrosa que reincorporó mayor cantidad de agua a nivel intracelular de los embriones expuesto a la solución de desvitrificación y por la que no desvitrifico de manera correcta de manera que la sucrosa disminuye la supervivencia del embrión e indica que podría deberse a que hay un efecto toxico de la sucrosa al embrión como indica Herrid et al (2016), y a la vez estos autores también utilizaron los crioprotectores la sucrosa y galactosa y que concluye que la galactosa fue mayor en la supervivencia embrionaria y que podría proporcionar una mayor protección de la membrana celular durante la desvitrificación que la sucrosa.

En tanto que, Ccasas et al. (2018), quienes reportaron embriones de llama sometidos al proceso de desvitrificación, embriones de calidad grado 1 con un tamaño promedio de 448.50 μm , este resultado es menor en diámetro embrionario al trabajo realizado, probablemente se debería a que los embriones iniciales utilizados fueron de menor diámetro, también se debería a la utilización de diferentes concentraciones de la sucrosa como crioprotector desvitrificante. En tanto que Vásquez et al. (2008) obtuvo 280 μm siendo el diámetro promedio de todos los embriones de llama del experimento. Y en el estudio preliminar realizado por Vásquez et al. (2007), reporto embriones desvitrificados, con un diámetro promedio de 450 μm , con respecto al presenta trabajo es de menor tamaño esto se podría deber a la utilización de la sucrosa ya que utilizo en una concentración de 0.5M y 0.2 M y por el tiempo de exposición también se debe a la utilización de embriones de menor diámetro que fueron utilizados, ya que su efectividad de los crioprotectores varían en función a la concentración utilizada como lo indican Gao et al., (995).

4.3 EVALUACIÓN DE LA TASA DE PREÑEZ

Tabla 3. Tasa de preñez post transferencia de embriones vitrificados en llamas receptoras

PROTOCOLOS DE VITRIFICACIÓN	EMBRIÓN TRANSFERIDO (N)	PREÑADAS 21 DÍAS N (%)	PREÑADAS 45 DÍAS (N)
TRATAMIENTO I	15	5 (33.33%) a	2
TRATAMIENTO II	15	3 (20.00%) a	0

($P > 0.05$)

En la tabla 3. Se muestra la evaluación de la tasa de preñez, en la que podemos observar que la tasa de preñez fue 33.33% (5/15), 20% (3/15) para las receptoras que recibieron los embriones vitrificados para T1 y T2 respectivamente, indican que no hay diferencia entre los tratamientos ($P > 0.05$). La evaluación presente estudio se determinó en base a la tasa de preñez en llamas receptoras luego de la transferencia de embriones desvitrificados mediante los 2 tratamiento de vitrificación lo cual nos indica que ambos tratamientos pueden lograr el mismo número de animales preñadas, todo ello se puede explicar a qué el número de receptoras no fueron en gran cantidad haciendo que un sola llama signifique un alto porcentaje. La tasa de preñez obtenida con embriones desvitrificados en el presente trabajo es mayor en comparación con los resultados obtenidos por Vásquez et al. (2008), quienes reportan 16.67% (2/12), y la tasa de preñez en llamas con embriones desvitrificados en la que también utilizo embriones de calidad excelente. Este mayor porcentaje de gestación en el presente trabajo se le atribuiría a la utilización de la diferente concentración del crioprotector utilizado para la



desvitrificación en la que utilizo una solución de la sucrosa 0.5 M seguida de una solución de sucrosa al 0.2 M el cual es importante la utilización de la concentración del crioprotector para la rehidratación del embrión. Las razones por las cuales se reduce la viabilidad de los embriones no están bien definidas en embriones de alpacas y llamas, pero es probable que se relacione al efecto osmótico directo o indirecto a la exposición de agentes crioprotectores, al respecto estudios han determinado que la exposición a algunos agentes crioprotectores, seguido de crio preservación reduce la sobrevivencia embrionaria mediante la interrupción irreversible de elementos del citoesqueleto como microfilamentos y micro túbulos de los embriones como indica (Roche, 1993).

Los resultados del presente estudio contrastados con el trabajo preliminar realizado por Vásquez. (2007), reporta que ninguna de las alpacas receptoras resultó preñada luego que transfirió los embriones desvitrificados, a pesar de que la calidad de la mayoría de los embriones fue de grado II (buena). Con respecto al presente trabajo es menor el % de gestación posiblemente se deba a que en el momento de la desvitrificación las concentraciones de 0.3 M de sucrosa, y 0.375 M de glucosa, donde indican el autor que podría deberse al efecto toxico del mayor tiempo que estuvo expuesto el embrión al crioprotector y que la última solución de vitrificación tenía mayor concentración lo que concuerda con lo mencionado por Gao et al., (1995) e indica que es de suma importancia la concentración ideal del crioprotector sobre los embriones y que permita obtener mejores tasas de sobrevivencia embrionaria y natalidad post desvitrificación.

Aller et al. (2002), reportaron en su estudio la tasa de preñez con embriones desvitrificados de 50% en donde utilizaron como medio de vitrificación (20% glicerol + 20% etilenglicol + 0.3 M sacarosa + 0.375 M glucosa + 3% poli etilenglicol), contrastado con los resultados del presente estudio la proporción de gestación es mayor, es mayor



porcentaje posiblemente se deba a que el número de receptoras transferidas con embrión desvitrificado solo fue de 4 llamas. Nuestros resultados comparados también son menores en cuanto a tasa de gestación a los obtenidos por Ccasas., et al (2014), que reportan 60% de llamas preñadas, pero que reporta que sus receptoras fueron en número de 5, donde el tamaño de muestra no fue significativo. Mientras que en el presente estudio el número de receptoras fueron 15 llamas receptoras para cada tratamiento respectivamente y esto influyó en el número de porcentaje de preñez.

En tanto, que Paredes., (2014), utilizó embriones de alpaca y realizó una congelación lenta utilizando dos crioprotectores logrando un 58.3% de gestaciones al diagnosticar entre los 30 días post transferencia y que finalmente reportaron que los 60 días disminuyeron por debajo del 30% de preñez.

En estudios realizados por Herrid et al (2016), reportaron 42.8 % de preñez con embriones desvitrificados en camellos en un estudio donde utilizaron la galactosa en el medio de desvitrificación el cual menciona que mejora la sobrevivencia y la tasa de desarrollo de los embriones vitrificados junto con otros Rail, (1987) mencionan que una de las estrategias comunes para reducir la toxicidad de los crioprotectores permeables y no permeables a los embriones es reducir el crioprotector en concentraciones y de esta manera obtener mayor sobrevivencia embriones y preñez futura.

En el presente estudio se realizó una segunda ecografía a los 45 días después de la transferencia del embrión desvitrificado en la que se observó 2 preñes para el T1 y ninguna para el T2, esta pérdida embrionaria en el presente estudio se debería a que las receptoras posteriores 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 como menciona Vasquez, (2008).



V. CONCLUSIONES

- a. La calidad y diámetro embrionario obtenido del embrión fresco fue grado I (excelente) con diámetro 678.75 μm y 723.14 μm para T1 y T2, posterior al proceso de vitrificación los embriones pararon a grado II (bueno) con diámetro promedio 667 μm y 887.31 μm para T1 y T2 respectivamente,
- b. Las tasas de preñez en llamas receptoras fueron similares para T1 fue del 33.3 % y T2 el 20%.



VI. RECOMENDACIONES

- a. Que sería necesario probar otras concentraciones de crioprotectores permeables y no permeables en la vitrificación de embriones de alpaca.
- b. Que se compare vitrificación de embriones de producción única y superovulados para explicarse mejor las diferencias.
- c. Realizar estudios de evaluación de viabilidad in vitro de los embriones desvitrificados y ser transferidos a receptoras.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aba, M., Forsberg, M., Kinvahl, M., Sumar, Y., & Edqvist, L. (1995). Endocrine changes after mating in pregnant and non-pregnant llamas and alpacas. *Act Vet Sci*, *36*, 489–498.
- Adams, G., Ratto, M., Huanca, W., & Singh, J. (2005). Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biol Reprod*, *73*, 452–457.
- Apaza Teram, M. del R. (2017). Transferencia de embriones por colectas repetidas y gestación en alpacas y llamas.
- Aray, A., Zeron, A., & Ocherenty. (2000). A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology*, *53*, 247.
- Bazer, F., Vallet, Y., Roberts, R., Sharp, D., & Thatcher, W. (1986). Role of conceptus secretory products in establishment of pregnancy. *J Reprod Fertil*, *76* (2), 841 – 850.
- Feldt, G., & Lasley, B. (1990). Ovarian follicular dynamics in the Llama. *Biol Reprod*, *43*, 271–281.
- Bravo, W., & Sumar, J. (1989). Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. *Anim Reprod Sc*, *21*, 271–281.
- Burghardt, R. C., Johnson, G. A., Jaeger, L. A., Garlow, J. E., Spencer, T. E., & Bazer, F. W. (2002). Integrins and extracellular matrix proteins and the maternal-fetal interface in domestic animals. *Cell Tissue Organ*, *172*, 202–217.
- Cassa Salas, A. (2018). Vitricación y calidad de embriones de alpaca (vicugna pacos) recuperados por superovulación utilizando la hormona gonadotropina coriónica equina (ecg).
- Celestinos, M., & Gatica, R. (2002). Vitricación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. *Arch Met Vet*, *34*, 157–165.
- Dobrinsky, J. (2002). Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*. *57*, 258–602.
- Dobrinsky, J., Pursel, V., Long, C., & Johnson, L. (2000). Birth of piglets after of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Bio Reprod*. *Bio Reprod*, *62*, 564–570.
- Galina, C., & Valencia, J. (2008). Reproduccion de animales domesticos. In *tercera edicion*. Editorial Limusa (p. 56).



- Ginther, O. J., Kastelic, J. P., & Knopf, L. (1989). Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil*, 87, 223–230.
- Guillomot, M. (1995). Cellular interactions during implantation in domestic ruminant. *Reprod Fertil Suppl*, 49(39–51).
- Hafez, E. (1996). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 6^a ed. México: Interamericana McGraw – Hill.
- Hafez, E. S. E. (2002). Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ma. Edición. Editorial. Editorial McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V. México.
- Herrid, M., Billah, M., Malo, C., & Skidmore, J. A. (2016). Optimization of a vitrification protocol for hatched blastocysts from the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *theriogenology*.2015.09.048
- Huanca, W, Cardenas, O., Olazábal, C., Ratto, M., & Adams, G. (2001). Efecto hormonal y empadre sobre el intervalo a la ovulación en llamas. *Rev Inv Vet Peru (Supl)*, 1, 462–463.
- Huanca, Wilfredo, Huanca, T., Embriones, T. De, Veterinaria, D. M., & Sciences, V. B. (2007). Biotecnologías reproductivas en camelidos sudamericanos domesticos : avances y perspectivas. 15, 195–201.
- Kaidi, S., Van Langendonekt, A., Massip, A., Dessy, F., & Donnay, J. (2001). Cellular alterations alter dilution of cryoprotective solutions used for vitrification of in Vitro produced bovine embryo. *Theriogenology*, 52, 515–525.
- Kasai, M. (2002). Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: development of ultrarapid vitrification. *Reprod Med Bio*, 1, 1–9.
- Kuleshova, L. L., MacFarlane, D., Trounson, R., & Shaw, J. (1999). Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology*, 38, 119–130.
- Leyva, V., & García, W. (1999). Efecto de la progesterona exógeno sobre la función del cuerpo lúteo de alpacas. *II Congreso Mundial Sobre Camélidos. Resumen*, 87.
- Liebermann, J., Nawroth, F., Isachenko, V., Isachenko, E., & Rahimi, G. (2992). Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod*, 67 (6), 1671–1680.
- Mammalian Critser, J. K., Agca, Y., & Gunasena, K. T. (1997). The cryobiology of mammalian oocytes. En: Karrow A.M., Critser J.K. (editors). Reproductive tissue banking. *San Diego: Academic Press*, 332–358.



- Marín, J. C., Zapata, B., González, B. A., Bonacic, C., Casey Wheeler, J., Bruford, A. E., Palma, R. E., Poulin, E., & Spotorno Alliende, M. (2007). Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular. *Rev. Chil. de Hist. Nat*, 80: 121-140.
- Nathalie, N., Jorge, M., Pinzón, E., Luis, J., Javier, P., Pérez, N., Ricardo, E., Jorge, B., Zambrano, L., Jiménez, C., & Mvz, E. (2014). Criopreservación de embriones equinos y primer reporte de un potro de raza criolla colombiana nacido por transferencia de un embrión equino vitrificado. 2, 21–32.
- Novoa, C. (1992). Reproduccion de camelidos. Univercidad Nacional de Mayor de San Marcos. *Rev Cienc Vet*, 8 (4), 9–11.
- Novoa, C., & Leyva, V. (1996). Reproducción en alpacas y llamas. Publicación científica. *IVITA* 26, 30, 3–18.
- Olivera, L., Zago, D., & Jones, C. (2003). Developmental changes at the materno – embryonic interface in early pregnancy of the alpaca (Lamos pacos). *Anat Embryol*, 207, 317–331.
- OLIVERA, L. V. (2015). Interacción Trofoblasto-Epitelio Uterino En La Formacion De La Placenta Epiteliocorial, Alpacas. *Revista Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Investigation*, 16(02), 2–9. <https://doi.org/10.18271/ria.2014.54>
- Palasz, A., Adams, G., Brogliatti, G., & Mapletofl, R. (2000). Effect of collection and of permeating cryoprotectans on llama (*Lama glama*) embryos and trophoblastic vesicles. *Theriogenology*, 53 (1), 341.
- Palomino, M., Avila, E., & Tabacchi, L. (1987). Estudio Clínico del parto en alpacas y llamas. *Rev Camel Sud*, 9, 18–27.
- Palomino, M., & Li, O. (2000). Congelación de embriones. In: Biotecnología del trasplante y micromanipulación de embriones de bovinos y camélidos de los Andes. *Edit. Importadores SA*, 256.
- Picha, Y., Tibary, A., Memon, M., Kasimanickam, R., & Sumar, J. (2013). Chronology of early embryonic development and embryo uterine migration in alpacas. *Theriogenology*, 79, 702–708.
- Rall, W., & Meyer, T. (1986). Fracture damage to de zonae of mammalian embryos cryopreservation and its avoidance. *Cryobiology*, 23, 557–558.
- Robinso, R., Fray, M., Wathes, D., Lamming, D., & Mann, G. (2006). In Vivo expression of interferon tau mRNA by the embryonic trophoblast and uterine concentrations of interferon tau protein during early pregnancy in the cow. *Mol Reprod Dev*, 73 (4), 470–474.



- Saito, N., Imai, K., & Tomisawa, M. (1994). Effect of sugars – addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology*, *41*, 1053–1060.
- San Martín, M., Copaira, M., Zuñiga, J., Rodríguez, R., Bustinza, G., & Acosta, L. (1968). Aspects of reproduction in the alpaca. *J. Reprod. Fertility*, *16*, 395–399.
- Santiani, A. W., Huanca, R., Sapana, T., Huanca, N., & Sepulveda, R. (2005). Effects of the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama paco*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian. J. Androl*, *7* (3), 303–309.
- Schneider, U., & Mazur, P. (1984). Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen–tawed embryos. *Theriogenology*, *21* (1), 68–79.
- SENAMHI. (2018). Dirección Regional Puno. Servicio Nacional de Meteorología Hidrología. Perú.
- Shamsuddin, M., Larsson, B., Gustaffson, H., Gustari, S., Bartolome, J., & Rodriguez Martinez, H. 1992. (1992). Comparative morphological evaluation of in vitro and in vitro produced bovine embryos. *International Congress on Animal Reproduction*, *3*, 1333–1335.
- Shaw, J., Kuleshova, L., Macfarlane, D., & Trounson, A. (1997). Vitrification properties of solutions of ethyleneglycol in saline containing pvp, ficoll, or dextran. *Cryobiology*, *35* (3), 219–229.
- Shaw, J., Wart, C., & Trounson, A. (1995). Evaluation of propanediol, ethyleneglycol, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow-cooled mouse pronuclear and 4 cell embryos. *Hum. Reprod*, *10* (2), 396–402.
- Skidmore, L. (2004). *Embryo transfer. Lecture Notes for the Shorter Course in Reproduction in the Dromedary Camel*. International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA.
- Sommerfeld, V., & Niemann, H. (1999). Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylenglicol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*, *38*, 95–105.
- Stevenson, Y. (1997). Clinical reproductive physiology of the cow. In: Current Therapy in large animal. *Theriogenology I, (supp)*, 257–267.
- Tanaka, H., Ballarales, P., Masaka, J., & Kanagawa, H. (1997). fecundación in Vitro. En: Teoría y practica de la fecundación in Vitro. *Cap V. JICA. Temuco-Chile*.
- Tibary, A., & Anouassi, A. (1997). *Theriogenology in camelidae. Actes Editions, Rabat, Morocco*.



- Vajta, G. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci*, 60–61, 357–364.
- Vásquez, M., Cueva, S., Cordero, A., Gonzales, M., & Huanca, W. (2011). Embriones de llamas sobre las tasas de supervivencia in vivo e in vitro e valuation of t wo e mbryo c ryopreservation m ethods in lama on the in tiene el método convencional , que consiste. 22(3), 190–198.
- Vasquez, M. del rosario. (2008). Evaluación de dos métodos de criopreservación de embriones sobre las tasas de sobrevivencia in vitro y preñez en llamas. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS.
- Vaughan, J., MacMillan, K. D., & Occhio, M. (2004). Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Anim Reprod Sci*, 80 (4), 353.361.
- Vivanco Mackie, H. W. (2918). Aplicación de tecnologías reproductivas en el Perú, su impacto en el desarrollo ganadero, retos por enfrentar. *Spermova*, 118–129.
- Wheeler, J., Chikhi, L., & BRuford, M. (2006). Case study in genetics of animal domestication: South American Camelids. En: Zeder M.A.; Bradley D.G.; Emshwiller E.; Smith B.G (eds). Documenting domestication: new genetic and archaeological paradigms. *Univ. of Calif. Press, Berkeley, USA*, 329–341.

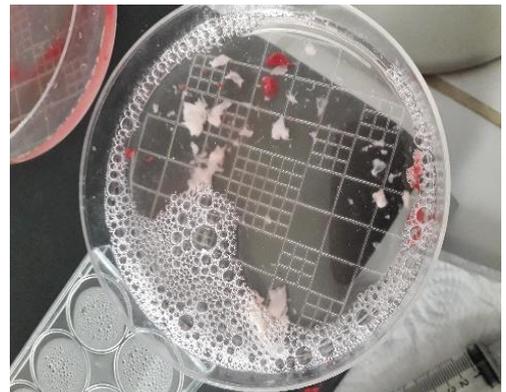
ANEXOS



Figura N° 7. Ecografía de la hembras donadoras.



Figura N°8 colección de embriones.



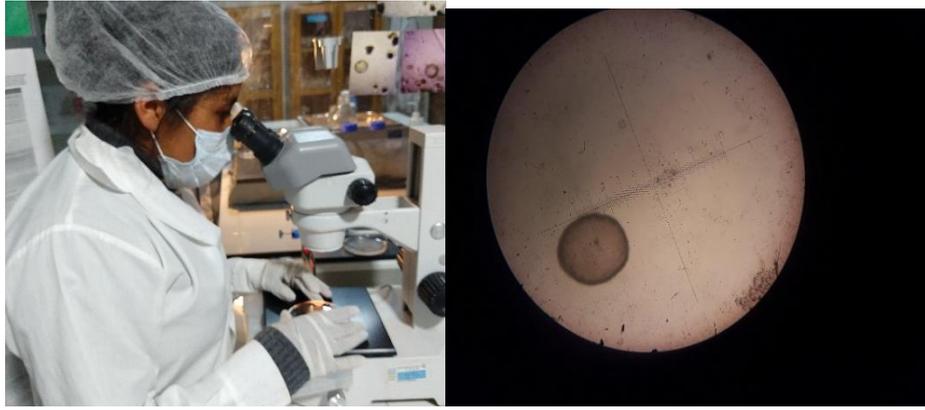


Figura N°9. Búsqueda y evaluación del embrión.

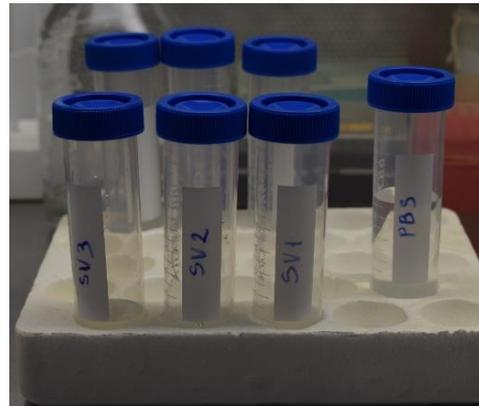


Figura N°10. preparación de medios de medios de vitrificación

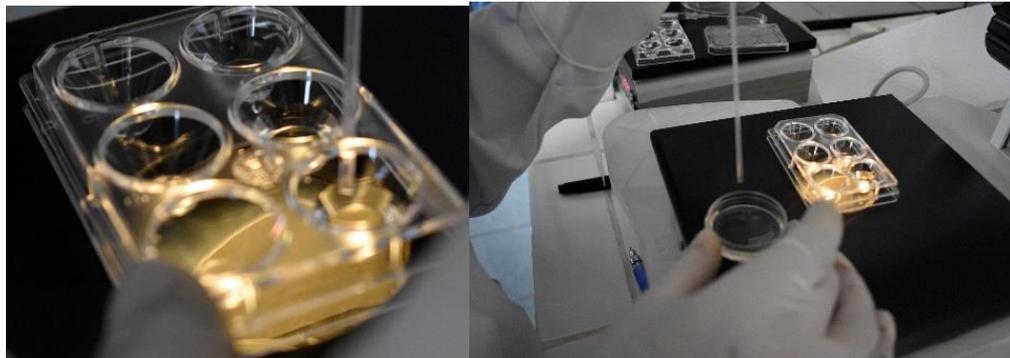


Figura N°11. vitrificación de embrión (paso de los embriones de la SV1, SV2 y SV3)



Figura N°12. Introducción al N2 L de la pajilla con el embrión



Figura N° 13. ecografía de las receptoras (presencia de cuerpo lúteo).

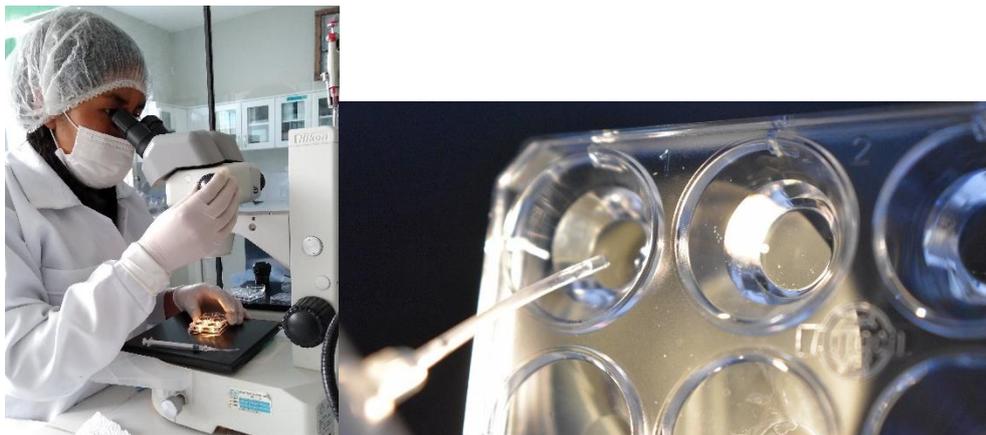


Figura N°14. Evaluacion de los embriones desvitricados.



Figura N°15. Evaluación ecográfica de las receptoras.



Figura N°16. Diagnostico de preñez de las receptoras a los 21 dias.