

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



**Efecto de la congelación sobre la viabilidad de embriones en
llamas, Ayacucho - 2018**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
MÉDICO VETERINARIA**

**PRESENTADO POR:
Nidia Maritza Quispe Quispe**

Ayacucho - Perú

2021

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA
TESIS

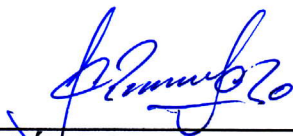
Efecto de la congelación sobre la viabilidad de embriones en llamas,
Ayacucho - 2018

Expedito : 21 de setiembre de 2021

Sustentado : 26 de octubre de 2021

Calificación : Muy Bueno

Jurados :



Ing. RAÚL ROBERTO CABALLA LEÓN
Presidente



M.V.Z. ALDO ALEXI CIPRIAN CARREÓN
Miembro



M.V. JULIO ALBERTO RUÍZ MAQUEN
Miembro



Mg. Sc. CÉSAR AUGUSTO OLAGUIVEL FLORES
Asesor

A Dios:

*Por sobre todas las cosas, por brindarme
vida, salud y sabiduría.*

A mi Familia:

*A mi mamá Hermenegilda y a mi hermano Max
Antonio por ser pilares importantes en mi vida que
día a día me demuestran su amor, cariño y apoyo
para seguir adelante, por su energía y confianza que
me brindaron durante la carrera.*

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, alma mater de mi formación profesional.

A la Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y sus docentes quienes me impartieron sus sabias enseñanzas y colaboraron para el logro de mi formación profesional.

Al Mg. Sc. Cesar Augusto Olaguivel Flores, por el asesoramiento brindado, por su paciencia, enseñanza y apoyo incondicional en la culminación del presente trabajo de investigación.

Agradezco a todas las personas que me apoyaron en el desarrollo de esta tesis por sus aportes en mi formación como Médico Veterinario: Amigos y Familia.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Índice general.....	iv
Índice de tablas	vi
Índice de figuras.....	vii
Índice de anexos.....	viii
Resumen.....	1
Introducción	2
CAPÍTULO I	
MARCO TEÓRICO	4
1.1. Antecedentes	4
1.2. La llama.....	7
1.3. Regulación neuroendocrina del ciclo reproductivo en camélidos sudamericanos	8
1.4. Dinámica folicular en camélidos sudamericanos.....	10
1.5. Desarrollo folicular y ovulación	12
1.5.1. Embriología del camélido	13
1.5.2. Recolección de embriones	14
1.5.3. Morfología embrionaria	14
1.5.4. Evaluación de embriones	14
1.5.5. Crio preservación de embriones.....	15
1.5.6. Principios básicos de criobiología.....	16
1.5.7. Crioprotectores para la solución	17
1.5.8. Congelación	18
1.5.9. Procedimientos para la crio preservación de embriones	19
CAPÍTULO II	
METODOLOGÍA	22
2.1. Ubicación	22
2.2. Materiales y equipos	22
2.2.1. Materiales.....	22
2.2.2. Equipos.....	23
2.2.3. Otros.....	23

2.3.	Problemas específicos	23
2.4.	Método procedimental	23
2.4.1.	Material biológico	23
2.4.2.	Obtención de embriones.....	23
2.4.3.	Recolección y evaluación de embriones	24
2.4.4.	Congelación de embriones	26
2.4.5.	Evaluación de la viabilidad embrionaria	26
2.5.	Análisis estadístico.....	26

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27	
3.1.	Calidad de embriones obtenidos por súper ovulación en llamas (<i>Lama glama</i>) 27	
3.2.	Calidad embrionaria post descongelación de llamas (<i>Lama glama</i>)..... 29	
3.3.	Viabilidad de embriones de llamas (<i>Lama glama</i>) post descongelación	30
CONCLUSIONES	33	
RECOMENDACIONES	34	
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	35	
ANEXOS.....	43	

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.1. Tiempo de pasaje del embrión desde el oviducto hasta el útero y fonación del blastocito en las diferentes especies.....	13
Tabla 1.2. Clasificación de grado de embrión en camélidos	15
Tabla 3.1. Clasificación de embriones obtenidos por superovulación en llamas (<i>Lama glama</i>)	27
Tabla 3.2. Promedio y calidad de embriones recuperados en llamas (<i>Lama glama</i>).....	27
Tabla 3.3. Calidad embrionaria pre congelación y post descongelación de embriones en llamas (<i>Lama glama</i>).....	29
Tabla 3.4. Porcentaje de viabilidad embrionaria post descongelación en llamas (<i>Lama glama</i>)	31

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1. Protocolo de súper ovulación en llamas donadoras de embriones	24

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Análisis estadístico.....	44

RESUMEN

Los objetivos de este presente trabajo de investigación, fueron determinar el efecto de la congelación sobre la viabilidad y calidad de embriones en llamas, realizado en el Centro Experimental Pampa del Arco de la E.P. de Medicina Veterinaria – Facultad de Ciencias Agrarias – UNSCH, para este trabajo se utilizó llamas; 4 donadoras de embriones que fueron sometidos a una alimentación de forraje verde y concentrado comercial para conejos. Las llamas donadoras de embriones fueron sometidas a un protocolo de superestimulación ovárica n= 4, día 0: ecografía+GnRH(1ml), día 3: 1000UI de eCG, día 7: PGF₂α(1ml), día 8: GnRH(1ml)+monta natural, día 15: colección de embriones+PGF₂α(1ml). Los embriones colectados fueron clasificados en grados del 1 al 5 (Skidmore et al. 2004), fueron aptos para la congelación los embriones con grado I y II. Se congelaron 24 embriones, el procedimiento de congelación, se realizó con la exposición de los embriones a una solución crioprotectora de 1,5M de EG (Vigro-Ethylene-Gycol®, Bioniche-Animal-Health, Pullman, USA) por un tiempo de 5min a temperatura ambiente, posteriormente, los embriones fueron cargadas en pajuelas de plástica de 0,25ml, sellados, rotulados y puestos en el congelador Freeze-Control-CL8800 (Cryologic®, Australia) a -6.5°C y después de un periodo de adaptación de 2 a 3min, se realizó la inducción de la cristalización (seeding), iniciándose la curva de congelamiento por un periodo de tiempo de 10min. a -6.5°C, y un descenso progresivo de la temperatura de -0,6°C/min hasta los -35°C. luego los embriones congelados fueron almacenados en nitrógeno líquido (-196°C). La descongelación de estos embriones se realizó a través de un Baño María a temperatura de 30°C por 30s, seguidamente puestas en una placa petri para ser purificados y colocados en un medio de cultivo SOFa; para de esta manera, ser evaluados, su viabilidad posterior al descongelado. Se obtuvieron (19/24) 79.16% de embriones sobrevivientes a la congelación.

Palabras clave: Congelación, viabilidad, embriones.

INTRODUCCIÓN

La crianza de llamas en el Perú es realizada por productores de muy escasos recursos, quienes utilizan esta especie como fuente proteínica (producción de carne) para la alimentación. La llama representa desde tiempos inmemoriales la identidad cultural de los pueblos altoandinos de Sudamérica. Anteriormente, estos animales eran utilizados como medio de transporte, este uso de la llama ha venido desapareciendo por ingreso masivo del transporte motorizado. La desaparición de esta especie representaría un golpe a la identidad cultural de una amplia población sudamericana, en cambio la aplicación de la biotecnología con éxito será un medio para incrementar la productividad y un aumento en los ingresos económicos para un amplio grupo social de las punas americanas quienes, en general, tienen como único medio de sustento proteico la crianza de la llama.

La producción de llamas representa uno de los pocos ingresos para una gran proporción de pobladores alto andinos, quienes no tienen mayor ingreso que las actividades pecuarias como la producción de fibra de alpaca, carne de alpaca. En ese sentido la producción de llamas es en la actualidad una de las actividades de importancia económica de los mencionados pobladores del ande. Las llamas pueden por su mayor aptitud cárnica representar una opción válida para obtener carne y procesarla en presentaciones novedosas lo cual incrementará el ingreso económico de los criadores. Para conseguir ello se tiene que utilizar la biotecnología reproductiva.

Dentro de la biotecnología reproductiva se encuentra un área importante que es la criobiología. Donde el material esencial ha sido la criopreservación de gametos para la reproducción asistida de los mamíferos, la cual ha permitido la preservación de embriones y células, y como también la distribución de material genético para las especies en vía de extinción y animales de producción. Con la aplicación del método de congelación convencional de embriones descrito por (Whittingham et, al., 1972), se

logra la conservación y distribución del material genético por todo el mundo, y posteriormente, se presentan otros descubrimientos como la utilización del crioprotector intracelular (etilenglicol) por (Voelkel y Hu, 1992), esto facilitó el procedimiento al permitir la realización de la transferencia directa de embriones, y de esta manera convirtiéndose en un sistema comercial con millonadas de preñeces por el mundo (Palasz y Mapletoft, 1996).

La aplicación y desarrollo de la biotecnología reproductiva en camélidos ha sido limitado por la presencia de diferentes factores. Los ensayos sobre congelación de embriones a nivel del país son muy escasos y no existen experiencias que se hayan desarrollado, ya que se requiere de un laboratorio equipado, personal capacitado y disponibilidad de animales que permita desarrollar un trabajo sostenido. Es necesario para poder avanzar, diseñar y desarrollar protocolos de congelación de embriones, para así contribuir en la expansión de un material genético de alta calidad a los rebaños y a los productores que apuestan por el cambio tecnológico, es decir como un material esencial en la mejora genética de los camélidos domésticos (Palasz et, al., 2000; Aller et, al., 2002; Lattanzi et, al., 2002).

La mayor parte de los descendientes obtenidos en los rebaños de los productores son fruto de cruzamientos aleatorios, por lo cual, solo unos pocos son de calidad, lo que está contribuyendo en la progresiva desaparición de los animales con características fenotípicas ideales, por lo tanto, dada la necesidad de diseñar y aplicar un plan de mejora genética que incluya la biotecnología reproductiva como una herramienta útil para la difusión de genes deseables que contribuyan a mejorar el ingreso económico de los productores, se planteó como objetivo determinar el efecto de la congelación sobre la viabilidad y calidad de embriones en llamas.

Objetivo general

Determinar el efecto de la congelación sobre la viabilidad de embriones en llamas.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la congelación sobre calidad de embriones en llamas.
2. Determinar el efecto de la descongelación sobre la viabilidad de embriones en llamas

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES

Paredes (2014) “El estudio fue realizada en el centro de Investigación y Producción Chuquibambilla de la Universidad Nacional del Altiplano Puno, en este estudio se utilizó en alpacas, 32 hembras donadoras y 24 hembras receptoras; tomado en cuenta ciertos criterios para su selección como: buena condición corporal, clínicamente sanas, buena amplitud de isquiones y con experiencia de ultimo parto. Siendo los objetivos, evaluar la sobrevivencia de los embriones a la congelación y descongelación por el método estándar con etilenglicol y Dimetilsulfóxido como crioprotectores y determinar su viabilidad en las receptoras. En el momento del empadre las hembras donadoras de embriones fueron apareadas con machos fértiles, y las hembras receptoras fueron apareadas con machos vasectomizados; y al 8to día post copula, se realizó un examen ecográfico y la recolección de embriones usando Suero Fisiológico +10% de suero fetal bovino. Fueron seleccionados para ser congelados los embriones de grado I y II, de acuerdo a la clasificación. 24 embriones de grado I y II fueron seleccionados para ser congelados, utilizando 2 crioprotectores, 12 fueron expuestos a Etilenglicol 1.5M y 12, a Dimetilsulfóxido 1.0M por un periodo de tiempo de 10min. como máximo. Posteriormente fueron envasados en pajuelas de 0.25 ml. Seguidamente el congelador manual fue calibrado a -6°C , para en el ser ubicadas las pajuelas cuando este marcó -7°C , y se mantuvo por un periodo de 1 min, para realizar el sembrado de núcleos de congelación con una pinza metálica, previa exposición del instrumento en nitrógeno líquido, posterior a 10min. se inicia un descenso de temperatura a una velocidad de $0.5-1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta -33 o -35°C y seguidamente se reservan las pajuelas en nitrógeno líquido. Para la descongelación, se mantiene a los embriones por 8s a temperatura ambiente, seguidamente son sumergidas en Baño Maria a 32°C por 2min. Luego se vierte el contenido a una placa Petri para purificar y rehidratar en un medio de mantenimiento +sucrosa 0.2M por 5min. Se obtuvieron 12/12 siendo el 100% de

embriones sobrevivientes a la congelación con Etilenglicol, frente a 8/12 haciendo un total de 66.7% con Dimetilsulfóxido, ($p \geq 0.05$). Posteriormente fueron transferidas a las receptoras y se realizó un diagnóstico de gestación entre los 50 a 60 días posterior a la transferencia, mediante un examen ecográfico; obteniendo como resultados con Etilenglicol 7/12 (58.3%) de embriones viables y con Dimetilsulfóxido 3/8 (37.5%), no encontrándose diferencia significativa ($p \geq 0.05$). La conclusión fue, que los embriones de alpacas congelados con Etilenglicol por el método estándar, no son estadísticamente diferentes a los congelados con Dimetilsulfóxido, tanto en viabilidad como en sobrevivencia”.

Vasquez, (2008) “En el presente estudio el objetivo fue evaluar el efecto de dos métodos de criopreservación sobre la sobrevivencia *in Vivo* e *in Vitro* de embriones de llama. Fueron recuperados no quirúrgicamente 73 embriones en estadio de blastocisto eclosionado, al día 6.5 después de la monta en las llamas con tratamiento de 1000 UI de eCG, y estos embriones fueron distribuidos aleatoriamente a cada uno de los siguientes grupos experimentales: control (n = 14), congelación lenta (n = 29) y vitrificación (n = 30). Congelación Lenta: En este grupo los embriones fueron expuestos a: Fosfato Buffer Salino (PBS) con 1.5M de Etilenglicol + 10% Suero Fetal Bovino (SFB) + 50 ug/ml de Gentamicina; y enseguida envasados en pajillas de 0.25 ml, sellados y enfriados durante 3 horas en un refrigerador, a una velocidad de enfriamiento de 0.12°C/min desde los 26°C hasta 5°C, y posteriormente las pajillas fueron transferidas al tanque de nitrógeno donde continuo el declive de la temperatura a razón de 5°C/min, desde 5°C hasta -20°C, por 5min; para finalizar se sumergió en nitrógeno líquido (N2L). Posterior a la descongelación se realizó la separación de los crioprotectores, utilizando las soluciones de dilución Sucrosa 0.25M y 0.12M. Vitrificación: en este grupo los embriones fueron expuestos a una solución de vitrificación (20 % Glicerol + 20 % Etilenglicol +0.5M Sucrosa + 10% Suero fetal bovino +50 ug/ml Gentamicina), en 2 pasos, y seguidamente fueron envasadas en pajillas de 0.25ml para luego ser sumergidos en nitrógeno líquido, posterior a ello, las pajillas fueron descongeladas en Baño Maria a una temperatura de 37°C por un minuto y automáticamente mezclados con 0.5M y 0.2M de sucrosa. Posteriormente se realizó la transferencia de embriones de los grupos experimentales; a razón de: 100% del grupo control, 50% de congelación lenta y 50% de vitrificación; evaluados *in Vivo*, hacia las hembras receptoras con previa sincronización; los embriones criopreservados fueron primero cultivados por 2 hrs. en PBS + 20% SFB, en

un horno a 35°C. La tasa de preñez fue de 30.77 % (4/13), 0 % (0/11) y 16.67 % (2/12) para las receptoras que recibieron los embriones de los grupos control, congelación lenta y vitrificación respectivamente, realizándoles un diagnóstico de preñez entre los 20 y 30 días, mediante ultrasonografía transrectal; no apreciándose diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). En la evaluación *in Vitro* los embriones criopreservados fueron cultivados en PBS + 20 % SFB, en una atmósfera compuesta por 5 % de CO₂, 20 % de O₂ y 75% de N₂, durante 1 hr. a 39 °C, para a continuación analizar su reexpansión embrionaria y morfología. Se registró cambios morfológicos, con disminución de calidad en mayor proporción en los embriones que fueron congelados. Reexpandieron un 57.14% (4/7) de embriones de congelación lenta y un 75% (9/12) de embriones vitrificados, siendo esta diferencia no significativa ($p < 0.05$). Este trabajo determino que ambos métodos de criopreservación redujeron la calidad embrionaria post-descongelación, presenciándose disminución de calidad en embriones congelados, determinada por las características morfológicas y aparición de cambios anormales en los embriones evaluados *in Vivo* e *in Vitro*. No siendo evaluado *in Vitro* el grupo control. Para la evaluación *in Vivo* los datos fueron analizados por las pruebas de Chi-cuadrado, Fisher exacta y ANOVA; y para la evaluación *in Vitro* Fisher exacta y T- de Student. Estos resultados nos permiten deducir que la vitrificación puede ser un método adecuado para la criopreservación de embriones en llamas”.

Carnero, (2011) “En un estudio realizado para evaluar las tasas de fertilidad mediante la transferencia de embriones ipsilateral y contralateral. Se utilizaron 10 llamas hembras como donadoras de embriones, que fueron sincronizadas con LH (1ml), superovuladas con 1000 UI de eCG provocando luteólisis con prostaglandina (1ml), siendo empadradas posteriormente. Se utilizaron 43 llamas receptoras de 4 a 6 años, las cuales el día del empadre se les realizo el tratamiento con LH con la finalidad de sincronizar con las donadoras. Pasado 7 días del empadre se realizó el lavado uterino para la recolección, evaluación y transferencia de embriones. La transferencia se realizó a los grupos experimentales con embriones frescos del mismo día de la recolección. Se obtuvieron resultados que señalan una tasa de preñez de 60% (Grupo 1) y 75% (Grupo 3) en hembras transferidas ipsilateral derecha e izquierda respectivamente, en cambio en hembras transferidas contralateral derecha e izquierda 30% (Grupo 2) y 25% (Grupo 4) respectivamente”.

Apaza, (2017) “En otro estudio realizado para evaluar la recuperación repetida de embriones en llamas y alpacas con una posterior transferencia intra e inter específica, se utilizaron como donadoras 6 alpacas Huacaya y 7 Suri, y como receptoras alpacas y llamas: (20 alpacas Huacaya, 20 alpacas Suri, 20 llamas Chaku y 20 llamas K'ara). Se realizó la sincronización de la onda folicular el día cero con la administración de GnRH (1.5 ml) tanto a las donadoras como también a las receptoras, se les administro prostaglandina el día 9 (0.25 mg en alpacas y 0.38 mg en llamas), el día 11 las donadoras fueron empadradas por monta natural y el día 8 post-copula se realizó el lavado uterino, para ello se tranquiliza, limpia y desinfecta la región perianal, se extrajo las heces, para guiar mejor el catéter de transferencia, tras ubicar la cervix; se realizó el lavado uterino con el medio y colectando el embrión en el filtro; tras concluido el lavado uterino a las donadoras se les administro prostaglandina (0.25 mg) para la inducción a la luteólisis y de esa manera reiniciar una nueva onda folicular; se realizaron 10 lavados uterinos con un intervalo de 10 días entre lavados. A las receptoras se les volvió a aplicar GnRH (1.5 ml) en el día 11, quedando ya preparadas para la transferencia del embrión. Se recuperaron un total de 46 embriones en donadoras de alpaca Huacaya, 33 en alpaca Suri. La recuperación de embriones en alpaca Huacaya fue de 88.68% y en alpaca Suri 80%; y a los 22 días de transferencia el porcentaje de preñez fue llama K'ara 55.55%, llama Chaku 77.77%, alpaca Huacaya 68.42% y alpaca Suri 66.66%. El porcentaje de gestación de los embriones por el diámetro fueron: ≤ 1 mm de diámetro 70% de preñez, > 1 y ≤ 2 mm de diámetro 64.1% de preñez, > 2 y ≤ 3 mm de diámetro 71.4% de preñez y > 3 mm de diámetro 75% de gestaciones”.

1.2. LA LLAMA

La llama (*Lama glama*) según investigaciones recientes basados en el estudio del ADN fue domesticada hace unos 6000 años en los Andes del centro y sur del Perú (Wheeler, 1995) a partir del guanaco (*Lama guanicoe*) (CONACS, 2005). Por ello existe una semejanza en el comportamiento social y en muchos de sus aspectos morfológicos a su progenitor. Se reconocen dos razas en estas especies: Chaku, llama lanuda y Qara, llama pelada (CONACS, 2005).

La llama tuvo gran relevancia en la época prehispánica, teniendo una amplia distribución en la costa y sierra, alcanzando una población superior a la de las alpacas, y jugando un papel importante en la economía local de las regiones. Del mismo modo se

sabe, que un grupo de llamas, regularmente acompañaba, a los ejércitos en el periodo incaico, de esa manera, acrecentó su distribución a lo largo de los Andes, desde la zona central de Chile hasta el sur de Colombia (CONACS, 2005).

La crianza de este animal es para la producción de carne y de trabajo (carga). Esta especie llega a tener un peso promedio de canal de hasta 52 kg. de carne de buena calidad óptima para el consumo humano. Reproductivamente la llama tiene similar comportamiento a los camélidos con un promedio de gestación de 11.5 meses y la parición generalmente de una cría (CONACS, 2005).

1.3. REGULACIÓN NEUROENDOCRINA DEL CICLO REPRODUCTIVO EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

“En toda especie vertebrada la función reproductiva es controlada por el neuropéptido (GnRH) hormona liberadora de las gonadotropinas. Mientras que, en las hembras de ovulación inducida, por ejemplo: gatos, conejos y camélidos; el estímulo somatosensorial genital durante la monta provoca la liberación de GnRH y el subsecuente surgimiento preovulatorio de LH”. (Bakker y Baum, 2000; Novoa y Leyva, 1996).

“La GnRH es secretada por el núcleo arcuato del cerebro, que está ubicado en el hipotálamo medio basal. La GnRH se libera por influencia de neuronas que tengan terminaciones nerviosas y contacten con el núcleo arcuato; este recibe elementos estimuladores como norepinefrina y epinefrina o elementos inhibidores como serotonina, dopamina y opioides endógenos”. (Birnbaumer et, al., 1985).

La liberación de la Hormona liberadora de las gonadotropinas es inducida por esteroides ováricos en el caso de las especies de ovulación espontánea. Los esteroides ováricos provocan la secreción pulsátil de la Hormona liberadora de las gonadotropinas hacia la hipófisis, y este se refleja como un estímulo para la secreción de la Hormona luteinizante. Así mismo en hembras de ovulación inducida, el comportamiento de la liberación de Hormona liberadora de las gonadotropinas es diferente, debido a que el Estradiol actúa en el cerebro generando comportamientos de proreceptividad o receptividad en el aspecto sexual y no directamente en la liberación de Hormona liberadora de las gonadotropinas. El mecanismo principal para la liberación de la

Hormona liberadora de las gonadotropinas, se da por la activación de las neuronas noradrenérgicas del cerebro medio y del encéfalo, como respuesta a estímulos de las neuronas somatosensoriales, y estos estímulos son ocasionados por la introducción del órgano copulador del macho durante el empadre. (Bakker y Baum, 2000).

El estradiol juega un papel importante en ovuladoras espontáneas en la función neuroendocrina, sin embargo, se reportó que las neuronas de la hormona liberadora de las gonadotropinas no poseen receptores para esteroides, por lo cual los esteroides no lograrían estimular directamente la síntesis de GnRH, sin la participación de neurotransmisores (Bhat et, al., 1998).

En los terminales nerviosos de la eminencia media se da la liberación de GnRH por la activación del hipotálamo medio basal la cual fue estimulada por las neuronas noradrenérgicas (Bakker y Baum, 2000). “La hormona liberadora de las gonadotropinas es conducida mediante el sistema hipotálamo-hipofisario hasta la hipófisis anterior”. (Arthur et, al.; 1991; Hafez, 1996). En la hipófisis anterior la GnRH impulsa la liberación de las gonadotropinas: hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), estas hormonas se encargan de la regulación de la esteroidogénesis y la maduración de gametos.

“La hormona folículo estimulante en los mamíferos es una hormona primordial para dar inicio el desarrollo y mantenimiento de los folículos ováricos; en presencia de la hormona luteinizante (LH) hace que los ovarios secreten estrógeno. La FSH estimula la aromatización de testosterona a estrógeno en las células granulosas del folículo, y la LH estimula la secreción de testosterona en la teca interna del folículo” (Hafez, 1996).

La función principal de la secreción de la Hormona luteinizante es la de inducir la ovulación, y posteriormente a ello ocurre la luteinización de las células del folículo ovulatorio, y se inicia la producción de progesterona P4, teniendo un efecto de retroalimentación negativa a nivel del hipotálamo, de esa manera previene la secreción de GnRH, inhibiendo la sensibilización de los gonadotrofos, de la hipófisis, a la acción de la Hormona liberadora de las gonadotropinas. (Stevenson, 1997).

La leptina es otra sustancia que participa como neurotransmisor en la regulación del eje hipotálamohipófisis (Zieba et, al., 2004), “esta hormona es una proteína sintetizada en el tejido adiposo y secretada a la circulación”. (Barb et, al., 2004). En estudios realizados, se observa que en ratas la leptina actúa sobre los axones terminales y en los cuerpos de las neuronas (Watanobe, 2002).

Se determinó que la leptina en la circulación, incrementa su concentración en el transcurso del desarrollo puberal, y en el suero sus niveles alcanzaron un umbral estimulador, que permitió la activación del eje hipotálamohipofisario, siendo este último asociado también a la disminución de la acción de retroalimentación negativa del estradiol y a la estimulación de la expresión del gen leptina en el adipocito (Barb et, al. 2004).

“La expresión del gen leptina en la pubertad de las vaquillas, coincide con un aumento en las concentraciones de IGF-I (factor de crecimiento similar a la insulina) en suero y al incremento de peso corporal” (García et, al., 2002). De igual forma la insulina y el IGF-I parecen intervenir en el rol de unión, entre la activación del eje reproductivo y el balance energético (Barb et, al., 2004).

1.4. DINÁMICA FOLICULAR EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Los camélidos sudamericanos muestran un desarrollo folicular en forma de ondas (Bravo y Sumar 1989; Adams et, al. 1990; Bravo et, al., 1990; Chaves et al. 2002; Vaughan et, al., 2004; Miragaya et, al., 2004). “Siendo parecido a lo observado en otras especies, presentando una fase de reclutamiento que es determinado por el crecimiento de varios folículos primordiales, con la posterior reducción a un selecto grupo y para finalizar surge un folículo dominante, con un diámetro ≥ 7 mm, según se describió en alpacas y llamas” (Adams et, al. 1990; Vaughan et, al. 2004).

“El folículo dominante presenta tres fases de desarrollo, crecimiento (incremento de diámetro folicular), estática (cambios mínimos en el diámetro) y regresión (disminuye su diámetro)” (Stevenson, 1997). Cuando el folículo dominante presenta regresión, se recluta un grupo de folículos antrales para la formación de la siguiente onda folicular (Ginther et, al., 1989). “Es posible que, en camélidos, la inhibina producida por el folículo dominante, actúe en la regresión de los folículos subordinados, así como sucede

en otras especies” (Fortune, 1994), necesitando también la acción sinérgica del estradiol y de otros reguladores intraovarios y FSH con menores niveles en el día de la desviación folicular (Ginther et, al., 1997).

“En estudios con llamas se obtuvo un promedio de duración de $4,8 \pm 1,5$ días para el folículo dominante en crecimiento (3-8, -10 o -12 mm), para la fase estática o de madurez folicular (folículos de 8- 12 mm) promedió $5.0 \pm 1,6$ días, y en la regresión folicular (desarrollo final 3 mm) promedió $4,0 \pm 1,1$ días, haciendo un total de 14 días aproximadamente” (Bravo et, al., 1990)

“En las llamas se registró tres diferentes condiciones fisiológicas del crecimiento folicular: anovulatorio (sin monta), ovulatoria pero no gestante (monta con macho vasectomizados) y ovulatoria gestante (monta con macho fértil), reportándose intervalos entre ondas de 20-25 días en llamas no servidas, 19.8 ± 0.7 días en llamas servidas con machos vasectomizados y 14.8 ± 0.6 días en hembras gestantes”. (Adams et, al., 1990).

El reporte en alpacas de intervalo entre ondas es de 15 días (Bravo y Sumar, 1989), parecido a lo establecido por Vaughan et, al. (2004), quien indica un intervalo de ondas de 12 días en el 39 % y 16 días en el 32 % de animales evaluados por ecografía. “Se concluye que, en llamas, el desarrollo de un subsiguiente folículo de una nueva onda folicular normalmente empieza en 2 - 3 días posterior al inicio de la regresión del folículo dominante de la onda anterior”. (Bravo et, al., 1990).

En la conducta de la receptividad de las alpacas y llamas hembras hacia el macho es determinada por la presencia de folículo ≥ 7 (Adams et, al., 1990, Vaughan et al., 2004), proponiendo que la capacidad ovulatoria de llamas y alpacas ante un estímulo de copula este determinado por el estadio de desarrollo folicular, crecimiento o estático en el momento de la monta (Cervantes et, al., 2007, Vaughan et, al., 2004, Bravo et, al., 1991); “en cambio los estadios ováricos con folículos en regresión, pueden mantener capacidad de ovulación, probablemente van a producir ovocitos en estadios de maduración avanzados o con cambios cualitativos, pero que manifestaran una menor tasa de gestación” (Cervantes et, al., 2007). “Estas diferencias presentadas en los estadios de crecimiento folicular al momento de la copula, podrían explicar algunos de los factores involucrados en la mortalidad embrionaria de alpacas y llamas”.

“Fue reportado que el diámetro máximo del folículo dominante anovulatorio, fue más grande que en llamas no preñadas (que no ovularon = $12,1 \pm 0,4$ mm; que ovularon = $11,5 \pm 0,2$ mm) que en llamas preñadas ($9,7 \pm 0,2$ mm). Sumado a eso, la lactación fue asociada con un diámetro máximo de folículo dominante más pequeño durante todos los estados reproductivos ($10,4 \pm 0,2$ mm) y con la disminución en el número de folículos (12)”. (Adams y Rato, 2001).

“Por esa razón la lactación y la presencia de un cuerpo lúteo, están asociados a la depresión del desarrollo folicular” (Adams et, al., 1990). El conocimiento detallado sobre las ondas foliculares ováricas, podría ayudarnos para la optimización del tiempo de monta, esto permitiría tener buenos porcentajes de fertilidad y un desarrollo de protocolos que nos faciliten el control del estado folicular ovárico en camélidos sudamericanos.

1.5. DESARROLLO FOLICULAR Y OVULACIÓN

“En las especies domesticas las hembras nacen con ovocitos y folículos ováricos con una cantidad ya definida, en su mayoría, ellos se atresiarán y nunca serán ovulados. A lo largo de la vida de una hembra, los folículos primordiales se mantienen en un estado de reposo y en cada cierto tiempo, algunos folículos son seleccionados para desarrollarse. El desarrollo folicular es un proceso continuo que culmina con la ovulación del folículo madurado y con la regresión del mismo”. (Galina y Valencia, 2008).

La dinámica folicular en llamas es similar a la de las hembras bovinas, por lo que se sigue un patrón clásico de ondas ya descritas, en cada una de las ondas foliculares que se presentan surge un grupo de folículos, siendo uno de ellos el folículo dominante que continuara su crecimiento hasta alcanzar un diámetro máximo de 9-16mm. “El folículo dominante tiene una acción inhibitoria llevando a los folículos subordinados a detener su crecimiento y atresiarse. Entre 1 y 3 días de comenzada la regresión del folículo dominante emerge la onda” (Adams et, al 1990; Bravo et, al., 1990).

En el crecimiento folicular interviene la proliferación y la diferenciación, esta se da por la estimulación de las hormonas de las células de la granulosa y de la teca, lo que conlleva a un aumento de la capacidad de producir folículos, de producir estradiol y de reaccionar a las gonadotrofinas. La producción de estradiol establecerá cuál de los

folículos tendrá los receptores de hormona luteinizante necesarios para la ovulación y luteinización. Las perturbaciones en las respuestas de la granulosa y teca a las señales gonadotrópicas interrumpen el crecimiento folicular (Hafez, 2000).

En los camélidos se dará la descarga del LH y la consecuente ovulación a través del estímulo de la introducción del órgano copulador; mientras el estímulo de la monta sola sin la introducción del pene, resultará una tasa de ovulación baja (Fernández-Baca et al., 1970). Para inducir a la ovulación en alpacas es suficiente con unos periodos de monta de 5 minutos como mínimo, esto en presencia de un folículo preovulatorio, así mismo también se reporta un 5% de ovulaciones espontaneas cuando la hembra está aislada del macho y luego se le presenta ante este (Bravo, 2002; Sumar, 1988).

1.5.1. Embriología del camélido

a) Desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario empieza con la división celular a partir del cigoto, y realizando su recorrido por el oviducto hasta ingresar en el útero, pero, la duración es específica en cada especie. Luego de algunas divisiones celulares, el embrión toma la forma de una pelota pequeña de células llamada mórula, luego estas células se ordenan dando lugar a que se forme una cavidad llena de líquido, entonces se denominara blastocisto (Hyttel et al., 2010).

Tabla 1.1. Tiempo de pasaje del embrión desde el oviducto hasta el útero y fonación del blastocito en las diferentes especies.

Especies	Pasaje dentro del útero		Tiempo en que se forma el blastocisto (días post ovulación)
	Días después de la ovulación	Estado de desarrollo	
Cerda	2	4-8 células	5-6
Vaca	3-3	8-16 células	7-8
Oveja	3	8-16 células	6-7
Yegua	5-6	mórula	6
Perra	8	blastocisto	8

Fuente: (Hyttel et al., 2010).

El desarrollo embrionario de alpacas a los 6 días post monta mórula. 8 días blastocisto joven y blastocisto expandido 10 días, vesícula embrionaria (Pérez, 1995).

1.5.2. Recolección de embriones

“La recolección de embriones en camélidos por lo general se hace del modo no quirúrgico. Se sujeta a la donante y se administra un sedante, luego se envuelve la cola para evitar la molestia de la misma, se limpian las heces del recto y la zona perineal. Algunas veces se coloca anestesia epidural, se atraviesa el cérvix con una sonda Foley y por el recto con la mano enguantada se ayuda a dicha manipulación. Una vez insertada la sonda en el cuerno uterina se llena el balo con 30 a 40 ml de aire para anclarlo, luego se introduce medio de lavado temperado y con suaves masajes se ayuda a evacuar el medio de lavado a través del catéter hacia el filtro colector, lavado que debe repetirse por lo menos tres veces con un mínimo de 500 ml” (Skidmore, 2000; Huanca et, al., 2004).

1.5.3. Morfología embrionaria

“Los embriones obtenidos a los 6 a 7 días del empadre, en hembras superovuladas, presentan una variación de tamaño entre 0.1 a 1 mm, y normalmente se encuentran en estadio de blastocisto expandido liberado. El diámetro promedio de un total de 163 embriones de llama y 19 embriones de alpaca, fue de $527.1 \pm 168.0 \mu\text{m}$ y $534 \pm 151.4 \mu\text{m}$, respectivamente. La expansión del trofoblasto se extiende desde un promedio de 1.2 mm en diámetro en el día 6.5 a 7.5, hasta 83 mm de longitud al día 13 a 14. Esta tasa acelerada de desarrollo embrionario se le podría relacionar al aparentemente reconocimiento materno temprano de la preñez en estas especies” (Adams et, al., 1991).

1.5.4. Evaluación de embriones

Los embriones se clasifican según a su aspecto morfológico, con el apoyo de una pipeta fina de vidrio, la que permitirá desplazar los embriones para evaluarlos desde distintos ángulos (Hafez, 2000; Palomino, 2000). Se debe observar la integridad de la membrana prelucida y su esfericidad (Palomino, 2000). El embrión debe tener un desarrollo en relación al día de la colección, los embriones se colectan hasta con un tiempo máximo de 48 horas de retraso (Hafez, 2000). “En los días 6to y 7mo, deben excluirse los embriones de menos de 32 células, por ello estas células deben de ser claras y de contorno regular, siendo la opacidad un signo de degeneración, este sistema de evaluación morfológica no constituye un test absoluto de la viabilidad embrionaria. Pero, se presentan diferencias significativas en el porcentaje de preñez cuando se

trasfieren embriones de calidad media con respecto a la calidad buena o excelente”. (Hafez, 2000; Palomino, 2000; Witenberg et, al., 1987).

Skidmore et, al. (2004), Propone una tabla de calificación para embriones en camélidos.

Tabla 1.2. Clasificación de grado de embrión en camélidos

Grado del embrión	Características
GRADO I	Embrión de excelente calidad, con tamaño acorde al tiempo de colección, perfectamente esférico y superficie plana
GRADO II	Embrión bueno, con las características del grado I pero con algunas irregularidades en el contorno.
GRADO III	Embrión de calidad media, embrión pequeño que presenta manchas negras, contorno irregular y con algunas células protruidas
GRADO IV	Embrión colapsado, exponiendo áreas oscuras degeneradas y con muchas células sobresalientes
GRADO V	Embrión muy oscuro, fragmentado, colapsado, no transferible

Fuente: (Skidmore et al. (2004).

1.5.5. Crio preservación de embriones

La criopreservación de embriones es una técnica fundamental que nos permite almacenar embriones de especies mamíferas en su amplia variedad sin que se pierda su capacidad de desarrollar y nacer vivos. En la actualidad se realiza la congelación y la descongelación de embriones de manera rápida, este proceso hace necesario deshidratar parcialmente al embrión antes de ser congelado con la finalidad de evitar la formación de cristales que lesionan los blastómeros (Mazur, 1977).

La criopreservación ha adquirido importancia debido a la producción de embriones por FIV y por OPU-FIV. Se debe tener en cuenta la existencia de 2 elementos fundamentales referente al embrión:

1. Está conformado por 80% de agua
2. Se comporta como una membrana semipermeable, por lo que reacciona a las diferencias de concentraciones osmóticas que hay en el medio en el cual se encuentra.

Por ejemplo, tenemos un blastocisto de excelente calidad y al momento de someterlo al proceso de congelación ultra rápida (de temperatura de laboratorio directamente a nitrógeno líquido), debido al alto contenido de agua en su interior presentara cristalización y muerte de la unidad embrionaria como tal.

Si lo sometemos a un proceso ultra lento, con una disminución lenta de temperatura hasta -40 o -50°C, también producirá muerte celular debido al llamado "efecto solución"; el embrión cuando se congela lentamente, presentara cristalización en el medio extracelular, tomando en cuenta que el cristal de hielo se comporta como secuestrador de agua, y debido al aumentando de su concentración en el medio extracelular, provocara que el embrión reaccione perdiendo agua para equilibrar, como esta deshidratación es tan brusca, se produce la muerte embrionaria.

En la naturaleza existen sustancias o agentes denominados crioprotectores, que tienen la propiedad de disminuir la acción deletérea del efecto solución cuando el embrión es sometido a una disminución lenta de temperatura. Se debe considerar que, cuando los embriones sean sometidos a diferentes técnicas de criopreservación estén en un estado de mórula compacta o blastocisto de excelente o buena calidad (entre los días 6 y 8).

1.5.6. Principios básicos de criobiología

Para la sobrevivencia de las células a la criopreservación, deben mantenerse sin daños y fisiológicamente funcionales durante todo el proceso (Bo et al., 2003). Cuando los embriones van a ser congelados, primeramente, son sumergidos y equilibrados en solución que contengan agentes crioprotectores (ACP) (Leibo, 2008). “Los crioprotectores son de bajo peso molecular y por ello previenen la deshidratación y degeneración de proteínas causada por la congelación del agua intra y extracelular, durante el proceso”. (Kanagawa, 1995). Debido a las propiedades de las membranas celulares, así como a las distintas dimensiones moleculares en los ACP, hacen que estos compuestos tengan diferentes tasas de permeabilidad hacia las células, que se cuantifican a través de coeficientes de permeabilidad. Además, la permeabilidad para un mismo ACP varia a lo largo del desarrollo embrionario, para cada uno de sus estadios, desde ovocitos hasta cigoto, y también la permeabilidad para un mismo ACP varía entre distintas especies embrionarias, aun teniendo el mismo estadio embrionario (Leibo, 2008).

“Cuando la célula pierde agua y es expuesta a una solución hipertónica depende de la permeabilidad al agua de la célula, la cual es una característica fundamental de cada célula ya dependiendo de la composición de la membrana celular y la superficie del área celular (μm^2). La permeabilidad de la célula al agua, comúnmente se refiere a su conductividad hidráulica (dada en unidades de $\mu\text{m}/\text{min atm}$), también depende de la temperatura de exposición, y de la proporción de la presión del vapor interno y externo, que es la diferencia en la presión osmótica de la solución dentro y fuera de la célula” (Leibo, 2008).

El tiempo es un factor muy importante debido a que las células son enfriadas en diferente tasa, “lenta”, “moderada”, “rápida” y aún “ultrarrápida”. Ya que, en las tasas de enfriamiento lento, el hielo crece lentamente en grandes cristales, secuestrando los solutos disueltos en canales entre cristales de hielo en cambio en tasa de enfriamiento elevado podremos observar que el hielo crece más rápido y los cristales son pequeños.

1.5.7. Crioprotectores para la solución

Durante el proceso de criopreservación es necesario deshidratar parcialmente los embriones, este proceso de deshidratación se logra añadiendo un agente crio protector con la finalidad de impedir la formación de cristales que dañan las estructuras citoplasmáticas. Existen dos clases de crioprotectores: permeables o intracelulares e impermeables (no permeables) o extracelulares.

a) Crioprotectores permeables

Por su bajo peso molecular estos crioprotectores son capaces de atravesar la membrana plasmática de forma activa o pasiva. Entre estos se encuentran los alcoholes como el etilenglicol, el glicerol, el propilenglicol o el sorbitol (Shaw et, al.,1995; Shaw et, al., 2000). Dimetilsulfóxido (DMSO), 1-2propanodiol, polietilenglicol, etanol entre otros (Miyake et, al., 1993). Y las aminas como la acetamida, la betaína, la formamida, la glutamina, la lisina o la taurina (Karrow, 1997). Entre los crioprotectores permeables más utilizados destacan: metanol, etilenglicol (EG), 1,2 propanediol, Dimetil sulfóxido (DMSO), 2,3 butanediol (PM=90,12), glicerol (G) (PM=92,10), entre otros (Bo et, al., 2003).

b) Crioprotectores no permeables

Presentan alto peso molecular, estos compuestos extraen el agua libre intracelular sin poder penetrar a la célula utilizando la diferencia de presión osmótica; son efectivos para preservar la estructura y funcionalidad de las membranas con baja actividad de agua; deshidratan junto con el crioprotector las células de los embriones. Entre estos se encuentran: polivinilpirrolidona (PVP), glucosa, fructosa, ficoll, dextrano sorbitol, sucrosa, lactosa, trealosa, rafinosa y otros azúcares. Los crioprotectores previenen la deshidratación total y la degeneración proteica, causada por la congelación del agua intra y extracelular durante el proceso. La etapa del desarrollo más apropiada para la vitrificación en etilenglicol es la mórula compacta y blastocisto temprano de embriones producidos in vivo o in vitro (Celestinos y Gatica, 2002).

1.5.8. Congelación

El método de congelación estándar fue elaborado por (Wilmot y Rowson, 1973). “En este método son expuestos los embriones al medio de congelación (PBS + G), en un solo paso de 10 a 30 minutos, a una temperatura ambiente de 20 - 22°C. En este período se incluye el envasado de los embriones en pajillas plásticas. Esto nos facilita realizar con mayor precisión y rápidamente la inducción de la cristalización o "seeding". Las pajillas deben ser ubicadas en un equipo de congelación a -7°C por un periodo de 5 minutos para equilibrar la temperatura de las pajillas con la del equipo; el "seeding" es realizada poniendo en contacto una placa metálica enfriada en nitrógeno líquido con la superficie de la pajilla; el agente refrigerante de la placa metálica puede alcohol, nitrógeno líquido o etanol enfriado por medio de un compresor, sino se realiza la cristalización se producirá la formación de cristales de hielo bajo un estado de superenfriamiento y una elevación repentina de temperatura (se genera calor latente de -10 a -15°C), causando un severo trauma físico que puede dañar las células”. (Celestinos y Gatica, 2002).

“Una vez realizado el “seeding”, se mantiene la temperatura estable durante 10 minutos (período de estabilización) y luego se desciende a una velocidad de entre 0.1 y 0.5 °C hasta -30 o -35 °C para establecer un adecuado balance entre deshidratación y formación de hielo intracelular, ya en este instante se pueden retirar las pajuelas del equipo de congelación y sumergirlas en nitrógeno líquido. La descongelación se

realizada de rápidamente, introduciendo las pajillas en baño María a 30 o 35 °C durante 20–30 seg”. (Celestinos y Gatica, 2002).

En otro método de congelación rápida, donde los embriones son deshidratados parcialmente, como ocurre en el método estándar, posterior a ello se les deshidrata nuevamente exponiéndolos en una solución mixta de sucrosa y glicerol. Esta última deshidratación genera condiciones de enfriado rápido en los embriones. Las pajillas son ubicadas en el cuello del termo de nitrógeno, por un periodo de 5 minutos, y posterior a ello son sumergidas en el tanque de nitrógeno líquido.

1.5.9. Procedimientos para la crio preservación de embriones

a) Selección de embriones

Este procedimiento se realiza después de la colección, de acuerdo a sus características morfológicas solo son colectados los embriones de buena calidad. Prontamente los embriones serán sometidos y purificados en medio buffer, enriquecida con SFB. Estos lavados se realizan con el fin de proteger a los embriones de la contaminación bacteriana y limpiar la superficie embrionaria del moco uterino (Palomino y Li, 2000).

b) Adición de crioprotectores

Una vez colectado los embriones deben ser deshidratados para poder evitar las formaciones de cristales que pueden lesionar las estructuras citoplasmáticas, la deshidratación será posible adicionando un crioprotector al medio de congelación. Existen varios procedimientos en donde el método se basa en la adición de crioprotectores en diferentes concentraciones en una solución buffer, puesto que los embriones permanecerán a una temperatura constante por un tiempo. Luego los embriones serán enfriados y congelados (Palomino y Li, 2000).

c) Colocación de embriones en pajuelas

“El envasado de los embriones es individual, en pajillas de cloruro de polivinílico con capacidad de 0.25 o 0.50 ml. El procedimiento se realiza de la siguiente forma: Se debe cargar aspirando columna de solución con el embrión, una columna de aire la pajilla es cargada aspirando una columna de la solución, una burbuja de aire y finalmente se completa con el medio; en este procedimiento se debe tener cuidado en la primera

columna pues si toca el tapón de la pajilla, como es de algodón y alcohol polivinílico se solidificará con el líquido, de esa manera se hará impermeable”. (Palomino y Li, 2000).

Una vez ubicados los embriones en las pajillas, son rotulados para poder iniciar el proceso de congelación, el cual es realizado con el apoyo de equipos especializados.

d) Descongelación de embriones

El proceso de descongelación debe realizarse rápidamente para evitar el crecimiento de los cristales de hielo desarrollados durante la congelación (Lehn-Tensen y Rall, 1983). “Mientras el proceso de descongelamiento lento concede tiempo suficiente como para permitir la descongelación extra e intra citoplásmica y ello puede generar a una baja sobrevida post-criopreservación y para evitar la baja sobrevida las pajillas son extraídas del nitrógeno líquido y sumergidas en baño María a 30°C aproximadamente” (Rall y Polge, 1984).

Se extraen las pajuelas del tanque de nitrógeno, y se mantienen al medio ambiente por 10s y luego por 1 min son colocadas a 37°C, y posterior a ello se colocadas en soluciones de sucrosa al 0.25 M y 0.12 M (Huanca et al., 2011).

La descongelación de embriones debe realizarse rápidamente, colocando las pajillas un en baño maría a 30-35°C por un tiempo de 20 a 30 seg. (Cabodevila et al., 1991). Los mayores porcentajes de sobrevida embrionaria, se ha observado que son obtenidos, cuando se realiza un calentamiento rápido (2.500°C/minuto).

“La extracción del glicerol se puede realizar, luego de retirar el embrión de la pajilla o con el embrión dentro de la misma. Para el primer caso, se puede llevar a cabo en una sola etapa, utilizando sucrosa, o en forma escalonada, empleando concentraciones decrecientes de glicerol o una mezcla de glicerol y sucrosa en PBS” (Heath, 1990).

Finalmente se deben evaluar los embriones descongelados para poder eliminar los que han sido dañados en el proceso de congelación. Se ha reportado que con la técnica de extracción del glicerol se logran porcentajes de preñez que normalmente superan el 50% (Niemann, 1985).

e) Eliminación de crioprotectores

“Para que los embriones descongelados, logren desarrollar su actividad, tanto in Vivo como in Vitro, una vez realizada la descongelación del embrión; los crioprotectores deben ser eliminados por completo mediante la rehidratación de sus células. Esto se realiza poniendo al embrión en soluciones de concentraciones descendentes del porcentaje de esta sustancia hasta llegar a 0, con la finalidad de impedir el shock osmótico que usualmente sucede en caso haya mucha sustancia crioprotectora y se lleve rápidamente a una solución salina isotónica” (Palomino y Li, 2000).

f) Evaluación pos descongelamiento

Es un procedimiento que debe realizarse para eliminar aquellos embriones que fueron afectados por el proceso de congelación. Solo serán transferidos los embriones de grado I y grado II, por sufrir estas menos lesiones durante el proceso de congelación/descongelación (Niemann, 1985; IETS, 1998).

Los crioprotectores se pueden remover de los embriones en 3 y 6 pasos de manera paulatina, hasta alcanzar una concentración final de fosfato buffer salino (PBS), sin crioprotector.

CAPÍTULO II METODOLOGÍA

2.1. UBICACIÓN

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Fisiología Veterinaria de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria - Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, ubicado en el distrito de Ayacucho de la provincia de Huamanga, Departamento de Ayacucho a una altitud de 2735 m.s.n.m., con una temperatura promedio de 12 - 18 °C, precipitación pluvial promedio de 500 mm, humedad relativa de 40 – 50%, latitud sur a 13°10'09" y 74°11'53" longitud oeste (Senamhi, 2013).

2.2. MATERIALES Y EQUIPOS

2.2.1. Materiales

- Etilenglicol+Sucrosa-VIGRO® Ethylene Glycol Freeze Plus with Sucrose
- Medio Holding
- Pajillas de 0.25ml
- Medio de mantenimiento de embriones
- Micropipetas de 10, 20, 1000µl
- Tips para Micropipetas de 10, 20, y 1000µl
- Placa petri 35x10mm
- Placa petri 90x15mm
- Alcohol polivinilico
- Bolsas plásticas 12x10 cm
- Cinta masking de 24 mm x 40 m
- Guantes descartables
- Buffer fosfato salino-PBS
- Nitrógeno liquido

- Tanque de nitrógeno para almacenar embriones
- Termo para descongelar embriones

2.2.2. Equipos

- Congelador de embriones- FREEZE CONTROL® CL-8800i- CryoGenesis™
- Estereomicroscopio AmScope
- Baño María
- Refrigeradora
- Platina térmica

2.2.3. Otros

- Mameluco
- Guardapolvo
- Cámara fotográfica
- Cronómetro
- Brete
- Tijera y Papel toalla

2.3. PROBLEMAS ESPECÍFICOS

- ¿Cuál será el efecto de la congelación sobre la calidad de embriones descongelados en llamas?
- ¿Cuál será el efecto de la descongelación sobre la viabilidad de embriones en llamas?

2.4. MÉTODO PROCEDIMENTAL

2.4.1. Material biológico

- Llamas donadoras de embriones – Proyecto FOCAM.
- La investigación se realizó con 24 embriones obtenidos por superovulación de llamas y tuvo una duración de 6 meses de enero a junio del 2019.

2.4.2. Obtención de embriones

Para iniciar con la obtención de embriones, previamente las donadoras fueron sometidas a una evaluación ecográfica de los ovarios durante dos días consecutivos, con el fin de

comprobar la existencia de folículos en crecimiento con un diámetro mayor a los 7 mm. Las donadoras que cumplían dicha condición recibieron 1ml acetato de gonadorelina para poder inducir la ovulación y fueron evaluadas 2 días después para constatar la ovulación del folículo dominante, y de darse el caso iniciar el tratamiento con las correspondientes, con la eCG. Como se puede observar en la figura 2.1.

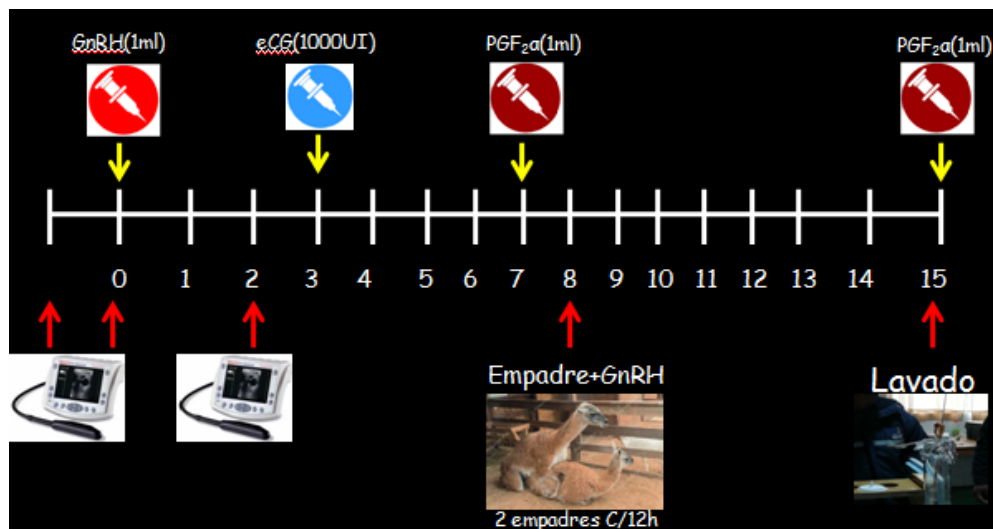


Figura 2.1. Protocolo de súper ovulación en llamas donadoras de embriones

Las hormonas para el proceso de obtención de embriones en llamas fueron las siguientes:

- GONASYN GDR® contiene Gonadorelina, análogo sintético de la hormona hipotalámica GnRH, en solución inyectable y su administración es por vía intramuscular (IM) profunda en una dosis de 1ml por animal.
- NOVORMON® 5000, Gonatrofina coriónica equina purificada, su administración es por vía intramuscular (IM) profunda en una dosis única de 800 y 1000 UI en cada tratamiento respectivamente por cada donadora.
- LUTALYSE® Dinoprost trometamina, como agente luteolítico, su administración es por vía intramuscular (IM) profunda en una dosis de 1ml por animal.

2.4.3. Recolección y evaluación de embriones

- La recolección de embriones fue realizado a los 7 días de realizarse el empadre, mediante un procedimiento no quirúrgico en hembras que presentaron en sus ovarios 2 o más cuerpos lúteos. Al inicio del proceso de recuperación de embriones

se administró a cada animal acepromacina Promazil® con una dosis de 0.3g para tranquilizarlas, seguidamente se pasó a inmovilizar al animal en un brete de sujeción diseñado específicamente para tal fin, seguidamente se procede a la evacuación del contenido rectal y se aplicó clorhidrato de lidocaína al 2% en una dosis de 2 ml, para conseguir la anestesia epidural caudal. Finalmente, se procedió a la eliminación de los contenidos fecales restantes y se realizó una limpieza de la zona vulvar (con agua y jabón carbólico y papel toalla desechable).

- La colección de embriones fue mediante la ubicación de la cervix e inmediatamente se atravesó esta con la ayuda de un dilatador cervical o mandril cubierto por la sonda Foley de 2 vías de 18 mm de diámetro y una camiseta sanitaria.
- La sonda Foley fue fijada en la luz del cuerno uterino por la insuflación del globo con aire de 20ml, para la obstrucción del mismo, pudiéndose comprobar con movimientos hacia la parte anterior y posterior de la sonda Foley con el aplicador.
- Para efectuar el lavado de los cuernos uterinos se utilizó el medio PBS Dulbecco (Sigma Aldrich, USA), previamente atemperada a 37° C, con dos repeticiones cada una de 250 ml, utilizando aproximadamente 500 ml de volumen total, este medio de lavado de PBS fue introducido por la sonda Foley conectada a la tubería en Y hasta palpar turgencia en los cuernos uterinos y para evitar el reflujo, y procedió a cerrar la tubería en Y.
- Se realizó leves masajes en el cuerno uterino, y seguido la liberación del medio de lavado.
- A todas las donadoras después del proceso de colección de embriones se les aplico 1ml de protaglandina f2 - LUTALYSE®.
- Después del lavado el contenido fue trasladado al laboratorio de Fisiología Veterinaria donde se realizó la búsqueda, evaluación y clasificación de embriones con la ayuda de un estereomicroscopio.
- “Se dejó por un tiempo de 10 minutos de sedimentación, el sobrenadante se sifoneó hasta dejar de 20 a 30 ml en el fondo del filtro, esta cantidad se vertió a una placa Petri”. (Pérez, 1994).
- La evaluación se realizó con un estereomicroscopio, poniendo especial atención en la zona pelúcida, blastómeros y color del embrión. Para lo cual tomamos como referencia la clasificación hecha por Skidmore et, al. (2004), descrita en tabla XXX. Se escogieron solo embriones de Grado I, II. Estos fueron aspirados

individualmente a una pajuela de 0.25mL con medio de mantenimiento y se mantuvo en platina térmica a 38.2°C, hasta el momento de su congelación.

2.4.4. Congelación de embriones

- La congelación solamente fue para aquellos embriones con grado I y II.
- Se congelaron 24 embriones, el procedimiento de congelamiento, se hizo a través de la exposición de los embriones a una solución crioprotectora de 1,5 M de EG (Vigro Ethylene Gycol®, Bioniche Animal Health, Pullman, USA) por un periodo de 5 minutos a temperatura ambiente.
- Y seguido a ello, los embriones fueron aspirados en pajillas plásticas de 0,25 ml, selladas y puestas directamente en la congeladora Freeze Control CL8800 (Cryologic®, Australia) a -6.5°C.
- Pasado un tiempo de adaptación de 2 a 3 minutos, se efectuó el proceso de inducción de la cristalización (seeding), iniciándose la curva de congelamiento con un periodo de tiempo 10 min a -6.5°C, y un decremento progresivo de la temperatura de - 0,6°C/min hasta los -35°C. Los embriones congelados fueron conservados en nitrógeno líquido (-196°C).

2.4.5. Evaluación de la viabilidad embrionaria

La evaluación de la viabilidad embrionaria de los embriones post descongelación de estos, este procedimiento se desarrolló con la ayuda de un estereoscopio y una platina térmica, donde se observaron todas sus estructuras, poniendo especial atención en la zona pelúcida. Tomando como referencia de calificación los parámetros establecidos por Skidmore (tabla. 2).

2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó una estadística descriptiva basada en promedios, y porcentajes. Los datos se organizaron en tablas y figuras para determinar la calidad y viabilidad embrionaria.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CALIDAD DE EMBRIONES OBTENIDOS POR SÚPER OVULACIÓN EN LLAMAS (*Lama glama*)

Se recolectaron un total de 49 embriones de los cuales fueron evaluados y clasificados de acuerdo a la calidad embrionaria propuesta por Skidmore et al. (2004), solamente embriones de grado I y grado II, con las siguientes características.

Tabla 3.1. Clasificación de embriones obtenidos por superovulación en llamas (*Lama glama*)

GRADO DE EMBRIONES	CARACTERÍSTICAS DE EMBRIONES
GRADO I	Embrión de excelente calidad, el tamaño corresponde al estado de colección en relación a la ovulación. Antes de los 8 días debe ser –perfectamente esférico con superficie lisa.
GRADO II	Embriones de buena calidad. Similar a los embriones de grado I, con algunas irregularidades del contorno y muy pocas células protruidas.

Fuente: (Skidmore et al. 2004)

La tabla 3.2 presenta el promedio y la cantidad de embriones recuperados por super ovulación de llamas donadoras de embriones, solamente se utilizaron 24 embriones de excelente y buena calidad para el proceso de congelación. Los embriones obtenidos fueron de excelente calidad y buena calidad embrionaria y representan el 36.7% y 30.6% respectivamente.

Tabla 3.2. Promedio y calidad de embriones recuperados en llamas (*Lama glama*)

Calidad de embriones					Total
Excelente	Buena	Regular	Mala	Intransferible	
18	15	5	3	8	49
(36.7%)	(30.6%)	(10.2%)	(6.1%)	(16.3%)	(100%)

Estos resultados que se presentan son inferiores a los conseguidos por Evangelista (2007) quien al realizar la superestimulación ovárica en llamas llegó a obtener 74.03% de embriones de excelente calidad y un 14.29% de embriones de buena calidad, esta variación se debería posiblemente al afecto de factores medio ambientales y el manejo, dado que existe una mejor respuesta de cada especie cuando se encuentra en su hábitat natural. Así mismo otro factor que podría influir en estos resultados es la utilización de la hormona, (Huanca, 2008) manifiesta que el uso de la FSH permite lograr mayor número de embriones de excelente calidad, mientras que la utilización de la Gonadotropina coriónica equina, permite lograr un número mayor de embriones de buena calidad, aunque las diferencias que se observan en ambos tratamientos no tuvieron diferencia estadística significativa. También coincide dicho análisis con lo reportado en otras especies domésticas, puesto que se muestra que los embriones obtenidos en las hembras tratadas con la hormona folículo estimulante fueron de calidad superior (Elsden y col, 1978; Monniaux y col, 1983).

Así mismo, reporto un 90,48% (19/21) de embriones clasificados como fértiles y un 9,52 % (2/21) fueron clasificados como degenerados ó muertos, los resultados que se obtuvieron fueron inferiores a los reportados por (Correa et al. 1997), esta variabilidad de la calidad embrionaria estaría dada por la donadora que fue sometida al proceso de superovulación, probablemente debido a una serie de cambios estructurales y hormonales en los oocitos y los líquidos foliculares respectivamente, durante el período preovulatorio y que posiblemente afectaría la fertilización y el desarrollo temprano del embrión. (Callensen et, al., 1986).

En una investigación en donde se aplicó la colección continua de recuperación de embriones en alpacas Huacaya (Gonzales, 2014) obtuvo un 66.25% y 67.21% de embriones de calidad A, esta diferencia se debería al proceso de colección que se realizó. Hasta el momento no se cuenta con investigaciones que especifiquen la calidad embrionaria en camélidos sudamericanos, como producto de la súper ovulación ovárica con Gonadotropina Corionica Equina, es por ello que el presente trabajo es un referente para la obtención de embriones de excelente y buena calidad.

3.2. CALIDAD EMBRIONARIA POST DESCONGELACIÓN DE LLAMAS (*Lama glama*)

Se tuvo una variación de 20.84% (5/24) en relación a la calidad de los embriones que fueron sometidos al proceso de descongelación, donde se observó una reducción en la calidad embrionaria de excelente y buena con la que iniciaron el proceso de congelación y llegando a calidad regular y mala.

Tabla 3.3. Calidad embrionaria pre congelación y post descongelación de embriones en llamas (*Lama glama*).

Embriones	Calidad embrionaria pre-congelación	Disminución de la calidad embrionaria post-descongelación	Disminución de la calidad embrionaria
Excelente	12	1	1/12
Buena	12	4	4/12
Total	24	5	5/24 (20.84)

La tabla 3.3 muestra la calidad embrionaria pre congelación y post descongelación, donde se observa que existe una disminución de 20.84% en relación a la calidad embrionaria, estos resultados son superiores a los reportados por Vásquez (2008) quien reporta una disminución de la calidad embrionaria de 57.14% (4/7) al someter a los embriones a una congelación lenta. Estas diferencias se atribuyen que en el presente estudio se utilizó como crioprotector Etilenglicol+Sucrosa y la sucrosa, por ser un agente crioprotector impermeable, favorece en las células embrionarias la deshidratación, durante la criopreservación, evitando la formación de cristales de hielo a nivel intracelular. En cambio, durante la descongelación mantiene una alta presión osmótica en el medio extracelular, de esta manera previene el shock osmótico y la lisis de las células embrionarias durante la separación del crioprotector (Rall, 1987). “Del mismo modo, durante el proceso de congelación y descongelación hay diversos factores que se consideran para garantizar el buen manejo, uno de estos factores a considerar es la concentración de los crioprotectores, porque en concentraciones muy elevadas pueden causar estrés osmótico y toxicidad; o la vitrificación del medio podría ser inadecuada (solidificación no homogénea), si la concentración es muy baja”. (Cuello et, al., 2008).

“Diferentes trabajos de investigación reportan que existe una sensibilidad del embrión a la congelación y que esta varía con especie y estadio; y esta sería un inconveniente a superar para una aplicación práctica del método de congelación. Se tiene que tener en cuenta la relación entre la ubicación, el estadio y la edad del embrión, que varía entre distintas especies. Los embriones hacen un recorrido por la unión utero-tubal ingresando al útero en el estadio de mórula a los 4 días en ratas y entre los 5 y 6 días en yeguas”. (Suárez, 2006), “en ovejas entre los días 4-5 y es un blastocisto formado en el día 6”. (Spencer et, al., 2007).

“Estudios realizados en llamas superovuladas, indican que se han recuperado blastocistos liberados, al día 7, o alrededor de este día, post copula”. (Huanca et, al., 2004; Von Baer et, al 2002; Palasz et, al., 2000), es decir alrededor de 6 días de edad del embrión (período monta-ovulación 30 Hrs, Huanca, 2001), lo que nos permite suponer que en alpacas al igual que en llamas (Cervantes, 2008) es mucho más rápido el desarrollo embrionario, en comparación con otros mamíferos, y por ende, los lavados uterinos, no quirúrgicos, podrían efectuarse antes del día 7 post copula. En tal sentido, en el presente estudio, la recuperación embrionaria fue el día 7 post copula. Cabe mencionar, que solamente los embriones en estadio blastocitos fueron sometidos al proceso de congelación en el presente trabajo.

“La calidad embrionaria está influenciada por las donadoras superovuladas, debido probablemente a los cambios hormonales y estructurales en los fluidos foliculares y oocitos respectivamente, durante el período preovulatorio y que podría afectar la fertilización y desarrollo embrionario temprano” (Callensen et, al., 1986).

3.3. VIABILIDAD DE EMBRIONES DE LLAMAS (*Lama glama*) POST DESCONGELACIÓN

Fueron considerados embriones viables todos aquellos que fueron sometidos al proceso de congelación/descongelación de embriones y mantuvieron su calidad embrionaria de excelente y buena.

Tabla 3.4. Porcentaje de viabilidad embrionaria post descongelación en llamas (*Lama glama*).

Embriones	Viabilidad embrionaria pre-congelación	Viabilidad embrionaria post-descongelación	Disminución de la viabilidad embrionaria
Excelente	12	11	1/12 (4.16%)
Buena	12	8	4/12 (16.6%)
Total	24	19	19/24 (79.16%)

La tabla 3.3 muestra la viabilidad embrionaria, donde se obtuvo (19/24) 79.16% de embriones sobrevivientes a la congelación. Estos resultados obtenidos son superiores a los reportados por Paredes (2014), quien reporta un porcentaje de 66.7% post descongelación de embriones en alpacas, así mismo mencionar que el autor en mención utilizó solamente Etilenglicol en el tratamiento I y Dimetil Sulfoxido en el tratamiento II. El presente resultado obtenido es superior debido a que en nuestro caso se utilizó como crioprotector Etilenglicol+Sucrosa y este tiene un efecto favorable en relación al índice de permeabilidad celular, por lo tanto, la facilidad de salir del embrión con rapidez y así evitar daños post descongelación, razón por la cual el etilenglicol se convirtió en el crioprotector de elección. (Skidmore y Loskutoff, 1999).

Así mismo, el porcentaje de viabilidad embrionaria post descongelación obtenida en el presente estudio es superior a lo reportado por Huanca et, al, (2011) en embriones de llama, quien reporta 62% de sobrevivencia post-descongelación con 10% de etilenglicol, esta diferencia se debe a que usó una tasa de congelación muy lenta 0.12°C/min/ 3 h, seguido, 5°C hasta -20°C, para finalmente sumergir las pajillas en nitrógeno líquido, ello genero una entrada muy lenta del crioprotector permeable a la célula consiguientemente se logró una deshidratación muy lenta, lo que produjo formación de hielo intracelular (Fair et, al., 2001). La membrana celular es muy sensible a refrigeración y ésta a menudo es dañada durante la criopreservación (Zeron et, al. 2002).

“La viabilidad embrionaria, como la categorización post descongelación están claramente relacionadas a la formación de cristales de hielo intra y extracelular, que puede originarse a consecuencia de las tasas de descenso térmico muy altas, donde el agua intracelular no tiene el tiempo suficiente para alcanzar el medio extracelular, se sobre enfría, alcanza temperatura de nucleación y finalmente se cristaliza dentro del

citoplasma. Así mismo si la tasa de ascenso térmico durante la descongelación no es lo suficientemente rápida, es posible que se produzca hielo intracelular como consecuencia de un nuevo pasaje a través de la temperatura de nucleación o crecimiento de pequeños cristales que pueden haberse generado durante el enfriamiento, esta puede iniciarse además, por un desequilibrio entre la concentración del crioprotector y la tasa de descenso térmico” (Kasai et, al., 1992; Mazur, 1963), sobre todo cuando no se ajustan adecuadamente la tasa de ascenso y descenso de temperatura (Mucci et al., 2006). Los daños no solo se producen en organelas intracelulares, Considerando que el colesterol está presente en la membrana plasmática, donde su nivel y la proporción con los fosfolípidos determinan en gran medida su fluidez y así su sensibilidad a la refrigeración (Horvath y Seidel 2006). Otro punto importante a considerar en la presente investigación es, que la congelación fue realizada con el uso de un congelador automático (Congelador de embriones- FREEZE CONTROL® CL-8800i-CryoGenesis™), que se atribuye la mejor uniformidad en el descenso de la temperatura.

CONCLUSIONES

1. La viabilidad embrionaria post descongelación en llamas fue de 79.16% de los embriones sometidos al proceso de congelación.
2. El efecto de la congelación de embriones influye en la viabilidad y calidad embrionaria post descongelación disminuyendo en 20.84%.

RECOMENDACIONES

- Congelar embriones de llamas en diferentes estadios.
- Congelar embriones comparando métodos de criopreservación de congelación frente a la vitrificación.
- Realizar trabajos de investigación para evaluar la tasa de preñez con la utilización de embriones congelados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, G. y Ratto, M. (2001).** Reproductive biotechnology in South American Camelids. *Rev Inv. Vet Perú.*
- Adams, G., Sumar, J. and Ginther, O. (1990).** Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *J. Reprod.*
- Adams, G., Sumar, J. and Ginther, O. (1991).** Form and function of the corpus luteum in llamas. *Anim. Reprod. Sci.*, 24: 127-138.
- Aller, J., Rebuffi, G., Cancino, A., Alberico, R. (2002).** Successful transfer of vitrified llama (*Lama glama*) embryos. *Anim Reprod Sci* 73: 121-127.
- Apaza, T. (2017).** Transferencia de embriones por colectas repetidas y gestación en alpacas y llamas URI: <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/3578>
Fecha: 2017-01-19
- Arthur, G. (1991).** Reproducción y obstetricia veterinaria. 1ª edición. Editorial Interamericana.
- Bakker, Y., Baum, M. (2000).** Neuroendocrine regulation of GnRH, release in induced ovulators. *Neuroendocrinology* 21: 220-262.
- Barb, C.R., Kraeling, R.R. 2004.** Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals. *Animal Reproduction Science* 82-83: 155-167.
- Bhat, K., Mahesh, B., Ping, L., Chorich, L., Wiedmeier, V., Brann, D. (1998).** Opioid-glutamate-nitric oxide connection in the regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 139: 955-960.
- Birnbaumer, L., Shahabi, N., Rivier, J. et al. (1985)** Evidence for a physiological role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) or GnRH-like material in the ovary. *Endocrinology*, 116, 1367–1370.
- Bo, G., Palasz, A., Mapletoft, R. (2003).** Criopreservación de embriones. In: Ungerfeld RM, eds. Reproducción en los animales domésticos. Tomo II. Melibea ediciones. Bhat et al., 1998
- Bravo, P. (2002).** The reproductive process in Sudamerican Camelids. Seagull Print, Salt Lake City. USA
- Bravo, P., Stabenfeldt, G., Lasley, B., Fowler, M. (1991).** The Effect of Ovarian Follicle Size on Pituitary and Ovarian Responses to Copulation in Domesticated South American Camelids. *Biol Reprod.* 45:553-559.

- Bravo, W. (1990).** Studies on ovarian dynamics and response to copulation en the South American camelids *Lama glama* and *Lama pacos*. Thesis Ph.D university of California, Davis U.S.A. Bravo, 2002; Sumar, 1988
- Bravo, W. y Sumar, J. (1989):** Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. *Animal Reproduction Science*. 21: 271-281.
- Cabodevila, J., Alberio, R., Palma, G., Iovannitti, B., Torquati, S. (1991).** Desarrollo "in vitro" e "in vivo" de embriones bovinos congelados utilizando un método estándar simplificado. *Rev. Arg. Prod. Anim.*
- Callensen, S., Greve, T., Hytell, P. (1986).** Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology* 25: 71-78.
- Carnero, S., Huanca, W., Cordero, A., Vásquez, M., Huanca, T. (2011).** Transferencia embrionaria ipsilateral y contralateral a la posición del cuerpo lúteo y supervivencia embrionaria en llamas. *Rev Inv Vet Peru* 22: 114-120.
- Celestinos y Gatica. (2002).** Vitrificación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. *Arch. Med. Vet.* XXXIV, Nº 2.
- Cervantes, M. (2008).** Momento óptimo post cópula para la recuperación de embriones del útero de alpaca mediante método no quirúrgico. Ms. Tesis. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. p 77.
- Cervantes, M., Huanca, W., Huanca, T. (2007).** Efecto del estadio del desarrollo folicular al momento de la monta sobre la ovulación y supervivencia embrionaria en alpacas. *Rev Invest Vet, Perú* 18(2): 122–128.
- Chaves, M., Aba, M., Agüero, A., Egey, J., Berestin, V. and Rutter, B. (2002).** Ovarian follicular wave and the effect of exogenous progesterone on follicular activity in non-mated llamas. *Anim. Reprod. Sci.*, 69: 37-46.
- CONACS, (2005).** Estrategia Nacional De Desarrollo Los Camélidos Domésticos en el Perú, Ministerio de agricultura.
- Correa, J., Ratto, M., Gatica, R. (1997).** Superovulation in llamas (*Lama glama*) with pFSH and equine chorionic gonadotrophin used individually or in combination. *Anim Reprod Sci* 46: 289-296. doi: 10.1016/S0378-4320(96)01615-6
- Cuello, C., Sánchez, J., Albiñana, C., Gil, M., Perals, M., Lucas, X., Roca, J., Vazquez, J., Martínez, E. (2008).** Effect of the cryoprotectant concentration on the *in Vitro* embryo development and cell proliferation os OPS-vitrified porcine blastocysts. *Cryobiology* 56:189-194.

- Elsden, R., Nelson, L., Seidel, G. (1978).** Embryo Transfer ano infertile cows. *Theriogenology* 9:17-26.
- Evangelista, S. (2007).** Respuesta ovárica y calidad embrionaria a la estimulación con gonadotropina coriónica equina (eCG) durante fase luteal inducida y fase no luteal en llamas. Tesis, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú.
- Fair, T., Lonergan, P., Dinnyes, A., Cottell, D., Hyttel, P., Ward, F., Boland, M. (2001),** Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Mol ReprodDev.* 58(2):186-95.
- Fernández-Baca, S., Madden, D. and Novoa, C. (1970).** Effect of different mating stimuli on induction ovulation in the alpaca. *J. Reprod. Fert.* 22: 3-20.
- Fortune, J. (1994).** Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod.* 50: 225-232.
- Galina, C. y Valencia, J. (2008).** Reproducción de los animales domésticos, Tercera edición. Editorial - limusa. México.
- Garcia, M., Amstalden, M., Williams, S., Stanko, R., Morrison, C., et al. 2002** Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. *J Anim Sci.* 80:2158-2167.
- Ginther, O., Kastelic, J. and Knopf, L. (1989).** Composition and characteristics of follicular waves during the bovine oestrous cycle *Animal Reproduction Science* 20 187-200.
- Ginther, O., Kot, K., Kulick, L., Wiltbank, M., (1997).** Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*, New York, v.48, n.1, p.75-87.
- González, M., Huanca, T., Cárdenas, O., Mamani, R., Sapana, R., Huanca W. (2014).** Efecto de la edad y el estado nutricional en la respuesta ovárica y calidad de embriones de alpacas. En: Mem XXXVII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Abancay: APPA. p 235-237.
- Hafez, E. (1996).** Reproducción e inseminación artificial en animales. 6ª edición. Ed. Interamericana- Mc Graw-Hill. México.
- Hafez, E. (2000).** Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. Editorial Mc Graw Hill – Interamericana. México

- Heath, T. (1990).** The identification and selection of embryos. Proc. 7th seminar of the dairy cattle society of the new zeland, pp.43-60.
- Horvath, G. and Seidel, J. (2006).** Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl-beta-cyclodextrin. *Theriogenology* 66 1026–1033.
- Huanca, T. (2008).** Efecto de la administració de gonadotropinas exógenas (FSH y eCG) en la respuesta ovárica y la producción de embriones en alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis Doctoral Universidad Santiago de Compostela-España. pp 31
- Huanca, W., Cárdenas, O., Olazábal, C., Ratto, M. y Adams, G. (2001):** Efecto hormonal y empadre sobre el intervalo a la ovulación en llamas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.* 1, 462-463.
- Huanca, W., Ratto, M., Santiani, A., Cordero, A., Huanca, T. (2004).** Embryo transfer in camelids: study of a reliable superovulatory treatment in llamas. In: 15th Internacional Congress on Animal Reproduction. Brazil
- Huanca, W., Vásquez, M., Cueva, M., Cordero, A. y Lino, M. (2011).** Evaluación de dos métodos de criopreservación de embriones de llamas sobre las tasas de supervivencia “in vivo” e “in vitro”. *Rev Inv Vet Perú;* 22 (3):190-19.
- Hyttel, P., Sinowatz, M., Vejlsted. (2010).** Essentials of domestic animal embryology, Sunders. El Servier Limited Cap 6, Pag 68-70.
- IETS-International Embryo Transfer. (1998).** Manual of the International ET society. 3 rd ed. Savoy. IL, USA.
- Kanagawa, H., Shimohira, I., Saitoh, N. (1995).** Manual of bovine embryo transfer. Japan: Japan Livestock Technology Association. 432 p.
- Karrow, A. (1997).** Pharmacological interventions in vitro. In: karrow am, critserjk, editors. Reproductive tissue banking. San Diego: academic press. pp 167-227.
- Kasai M., Hamaguchi, Y., Zhu, S., Miyake, T. and Machida, T. (1992).** High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene-glycol-based solution by a simple method. *Biol Reprod* 46(6):1042-1046.
- Lattanzi, C., Santos, C., Chaves, G., Miragaya, M., Capdevielle, E., Judith, E., Agüero, A., Baranao, L. (2002).** Cryopreservation of llama (*Lama glama*) embryos by slow freezing and vitrification. *Theriogenology* 57: 585 (Abstr).
- Lehn-tensen, H., Rall, W. (1983).** Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing. *Theriogenology* 19:263-277.

- Leibo, S. (2008).** Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology* 69, 37-47.
- Mazur, P. (1963).** Studies on rapidly frozen suspensions of yeast cells by differential thermal analysis and conductometry. *Biophys J* 3:323-353.
- Mazur, P. (1977).** Slow-freezing injury in mammalian cells. En: *The freezing of mammalian embryos*. Elsevier. Amsterdam pp. 19-48.
- Miragaya, M., Aba, M., Capdevielle, E., Ferrer, M., Chaves, M., Rutter, B. and Agüero, A. (2004).** Follicular activity and hormonal secretory profile in vicuña (*Vicugna vicugna*). *Theriogenology*, 61: 663-671.
- Miyake, T., Kasai, M., Zhu, T., Sakurai, T., and Machida, T. (1993).** Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol based solution by a simple method. *Theriogenology* 40: 121-134.
- Monniaux, D., Chupin, A. and Saumande, J. (1983).** Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19: 55-81.
- Mucci N., Aller, J., Cabodevilla, J., Kaiser, G., Hozbor, F. and Alberio, R. (2006).** Criopreservación de embriones bovinos. *Sitio Argentino de Reproducción animal* 7: 20-35
- Niemann, H. (1985).** Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology*, 35: 109-123.
- Novoa C, Leyva V. (1996).** Reproducción en alpacas y llamas. Publicación científica IVITA N° 26. 30 p.
- Palasz, A., Adams, G., Brogliatti, G., Mapletofl, R. (2000),** Effect of collection and of permeating cryoprotectants on llama (*Lama glama*) embryos and trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 53 (1): 341.
- Palasz, A., Mapletof, R. (1996).** Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotechnology Advances*. 14: 127-149.
- Palomino, H. (2000).** Biotecnología del trasplante y micromanipulación de embriones de bovinos y camélidos de los Andes. Perú: AFA Ed Importadores. 444 p.
- 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 p.
- Paredes, A. (2014).** Efecto de la congelación en la sobrevivencia y viabilidad de embriones de alpaca, tesis Universidad Nacional del Altiplano-Puno-Perú.

- Pérez, G. (1995).** Efecto de la GnRH, sobre el desarrollo folicular, métodos de inducción y ovulación de embriones en alpacas. Tesis para optar el grado de magister en ganadería alto andina. UNA-Puno.
- Pérez, M. (1994).** Efecto de la GnRh (Gonadorelin) sobre el desarrollo folicular, método de inducción de ovulación y embriones en alpacas. Tesis Maestría Ganadería Andina. 75 pp.
- Rall, W. (1987).** Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24: 387 – 402.
- Rall, W. and Polge. (1984).** Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glicerol. *J. Reprod. Fert.* 70:20285-292
- SENAMHI, Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología, (2011).** Reportes Enero-Abril Shaw J., A. Oranratnachai and A. Trounson. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 53(1): 59-72
- Shaw, J., Oranratnachai, A., Trounson, A. (2000).** Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53:59-72.
- Shaw, J., Wart, Ll., and Trounson, A. (1995).** Evaluation of propanediol, ethylene glycol, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow-cooled mouse pronuclear and 4-cell embryos. *Human reproduction* 10 (2): 396-402
- Skidmore, J. (2000).** Embryo transfer in the dromedary camel (*Camelus Dromaderius*) International Veterinary Information Service.
- Skidmore, J., Billah, M. and Loskutoff, N. (2004).** Developmental competence in vitro and in vivo of cryopreserved hatched blastocysts from the dromedary came (*Camelus Dromedaries*). *Reprod. Fertil. Dev.* 16: 605-609.
- Skidmore, J., Loskutoff, N. (1999).** Developmental competence in vitro and in vivo of cryopreserved expanding blastocysts from the dromedary camel (*Camelus Dromedaries*). *Theriogenology* 51, 293 abstract.
- Spencer, T., Johnson, G., Bazer, F., Burghardt, R., Palmarin, M. (2007).** Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reprod Fertil Dev* 19: 65-78.
- Stevenson, J. (1997).** Clinical reproductive physiology of the cow. En: *Current Therapy in large animal. Theriogenology.* Edit by Younquist,R.

- Suarez, S. (2006).** Gamete and Zygotes transport. In: Neill, J eds. Physiology of Reproduction. Vol 1. (CD-ROM). 3rd ed. USA: Elsevier Academic Press. 3269 p.
- Sumar J. (1988).** Removal of the ovaries or ablation of the corpus luteum and its effect on the maintenance of gestation in the alpaca and llama. Acta Vet. Scand. Suplemento 83: 133-141
- Vásquez E, Martha E. (2008).** Evaluación de dos métodos de criopreservación de embriones sobre las tasas de sobrevivencia in vitro y preñez en llamas, tesis de grado.
<http://hdl.handle.net/20.500.12390/2141>
- Vásquez, M., Cueva, S., Cordero, A., Gonzales, M., Huanca, W. (2011).** 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.
- Vaughan, J. (2004):** Artificial breeding in alpacas. 4 th European Symposium on South American Camelids and DECAMA European Seminar, Gottingen, 7 – 9 October, 2004, Germany. Abstracts. Ed. M. Gerken, C. Renieri, M. Gaulty and A. Riek.
- Voelkel, S., Hu Y. (1992).** Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology. 37:23–37.
- Von Baer, A., Del Campo, M., Donoso, X., Toro, F., Von Baer, L., Montecinos, S., Rodríguez-Martínez, H., Palasz, A. (2002).** Vitrification and cold storage of llama (*Lama glama*) hatched blastocysts. Theriogenology 57: 489 (Abstr).
- Watanabe, Y. et al. (2002)** Role of the glutamic and aspartic residues in Na⁺-ATPase function in the ZrENA1 gene of *Zygosaccharomyces rouxii*. *FEMS Microbiol Lett* 209(1):39-43
- Wheeler, J. (1995)** Evolution and present situation of the South-American Camelidae. Biological Journal of the Linnean Society 52: 271-295.
- Whittingham, D., Leibo, S., Mazur, P. (1972).** Survival of mouse embryo frozen to -196 and -296°C. Science. 178: 411-414.
- Wilmut, I. and Rowson, L. (1973).** Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. Vet. Rec. 92: 686-690.
- Withenberg T. C. Sevell. (1987).** Atlas du développement embryonnaire précoce chez le ovins. inra station de physiologie animal ejoy en josas. Publ. Versaillespp 51.

- Zeron, Y., Tomczak, M., Crowe, J. and Arav, A. (2002).** The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. *Cryobiology* 45 143–152.
- Zieba, D., Amstalden, M., Morton, M., Keisler, D. and Williams, G. (2004).** Regulatory roles of leptin at the hypothalamic–hypophyseal axis before and after sexual maturation in cattle. *Biology of Reproduction* 71 804–812doi:10.1095/biolreprod.104.028548.

ANEXOS

Anexo 1.
Panel fotográfico



Foto 1. Centro experimental Pampa del Arco-animales experimentales



Foto 2. Llamas donadoras de Embriones.

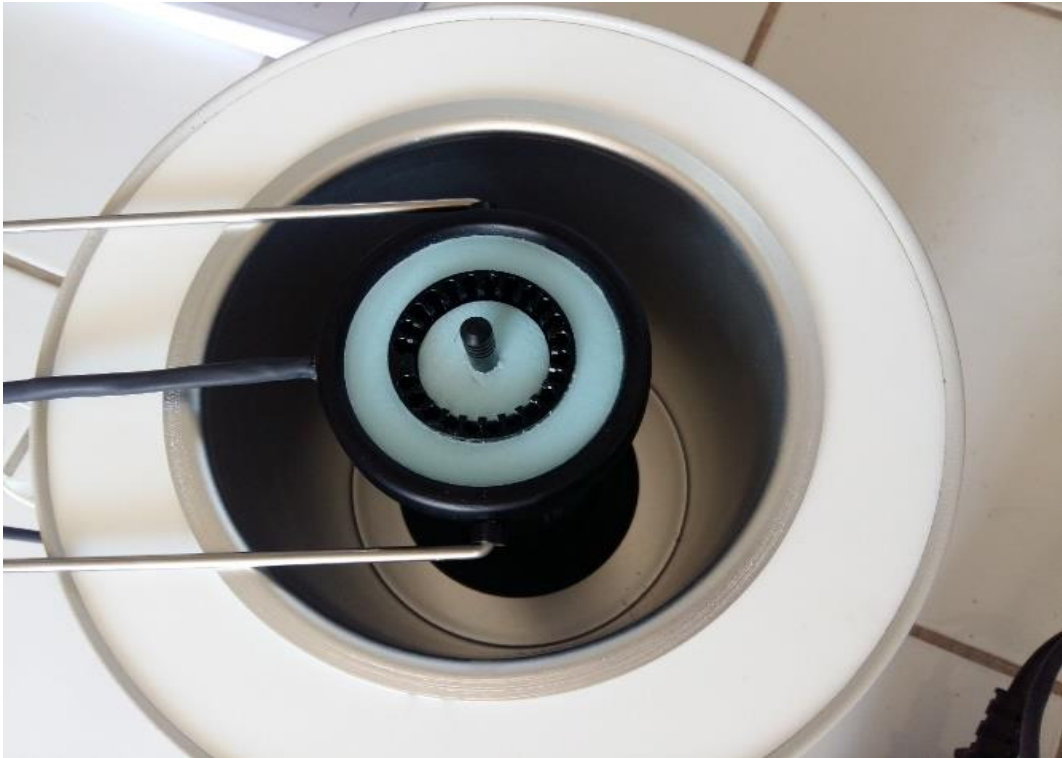


Foto 3. Congelador de embriones FREEZE CONTROL® CL-8800i- CryoGenesis™



Foto 4. Estereomicroscopio AmScope



Foto 5. Tanque de nitrógeno líquido



Foto 6. Platina termina para mantener temperatura adecuada para los embriones y medios.



Foto 7. Preparación de donadoras de embriones



Foto 8. Preparación de medio para la evaluación de embriones



Foto 9. Embriones clasificados para el proceso de congelación



Foto 10. Congelación de embriones



Foto 11. Proceso de congelación



Foto 12. Almacenaje de embriones post congelación



Foto 13. Evaluación de calidad embrionaria post descongelación



Foto 14. Evaluación de viabilidad embrionaria post descongelación.

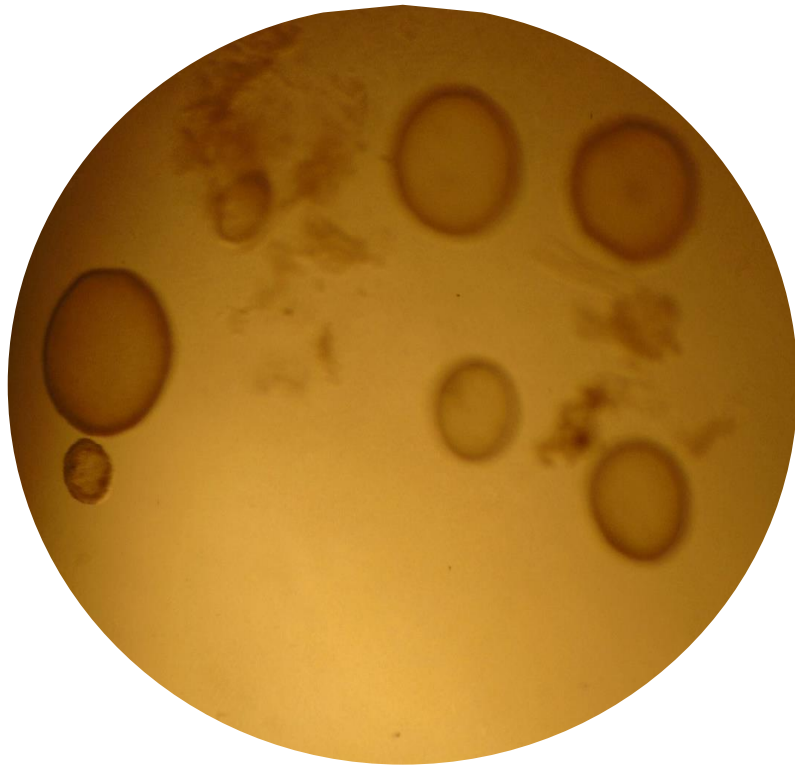


Foto 15. Embriones obtenidos para el proceso de congelación



Foto 16. Embrión de excelente calidad post descongelación.



UNSCH

FACULTAD DE CIENCIAS
AGRARIAS

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

El presidente de la comisión de docentes instructores responsables de operativizar, verificar, garantizar y controlar la originalidad de los trabajos de tesis de la Facultad de Ciencias Agrarias, deja constancia que el trabajo de tesis titulado;

“Efecto de la congelación sobre la viabilidad de embriones en llamas, Ayacucho - 2018.”

Autor : Nidia Maritza Quispe Quispe

Asesor : Cesar Augusto Olaguivel Flores

Ha sido sometido al análisis del sistema antiplagio TURNITIN concluyendo que presenta un porcentaje de 29 % de similitud.

Por lo que, de acuerdo al porcentaje establecido en el Artículo 13 del Reglamento de originalidad de trabajos de investigación de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, es procedente otorgar la Constancia de Originalidad.

Ayacucho, 12 de noviembre de 2021

Ing. WALTER AUGUSTO MATEU MATED
Presidente de comisión

Efecto de la congelación sobre la viabilidad de embriones en llamas, Ayacucho - 2018

por Nidia Maritza Quispe Quispe

Fecha de entrega: 12-nov-2021 06:43p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 1701235337

Nombre del archivo: TESIS_NIDIA_MARITZA_QUISPE_QUISPE.pdf (1.28M)

Total de palabras: 13494

Total de caracteres: 77038

Efecto de la congelación sobre la viabilidad de embriones en llamas, Ayacucho - 2018

INFORME DE ORIGINALIDAD

29%

INDICE DE SIMILITUD

29%

FUENTES DE INTERNET

7%

PUBLICACIONES

8%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet	9%
2	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	8%
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
4	repositorio.unamba.edu.pe Fuente de Internet	2%
5	dspace.usc.es Fuente de Internet	1%
6	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	1%
7	docplayer.es Fuente de Internet	1%
8	datateca.unad.edu.co Fuente de Internet	1%
9	sisbib.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	

<1 %

10

scielo.isciii.es

Fuente de Internet

<1 %

11

Submitted to Universidad Nacional del Centro del Peru

Trabajo del estudiante

<1 %

12

fr.scribd.com

Fuente de Internet

<1 %

13

www.alpa.org.ve

Fuente de Internet

<1 %

14

www.produccion-animal.com.ar

Fuente de Internet

<1 %

15

1library.co

Fuente de Internet

<1 %

16

www.redalyc.org

Fuente de Internet

<1 %

17

Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga

Trabajo del estudiante

<1 %

18

www.reproduccionanimal.org

Fuente de Internet

<1 %

19

revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

20 tesis.unap.edu.pe <1 %
Fuente de Internet

21 repositorio.unprg.edu.pe <1 %
Fuente de Internet

22 humrep.oxfordjournals.org <1 %
Fuente de Internet

23 www.yeastgenome.org <1 %
Fuente de Internet

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Apagado