

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**“EFECTO DE LA CONGELACION EN LA SOBREVIVENCIA Y
VIABILIDAD DE EMBRIONES DE ALPACA”**

TESIS

PRESENTADO POR:

Bach. ALDO FREDERIC PAREDES CCASO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2014

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

**“EFECTO DE LA CONGELACIÓN EN LA SOBREVIVENCIA Y VIABILIDAD
 DE EMBRIONES DE ALPACA”**

TESIS

PRESENTADA POR:

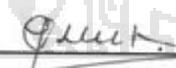
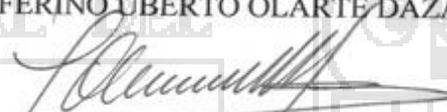
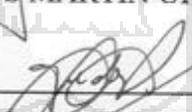
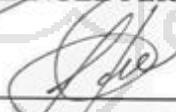
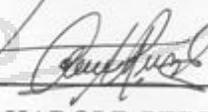
Bach. ALDO FREDERIC PAREDES CCASO

A LA DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
 ZOOTECNIA DE LA UNA – PUNO, COMO REQUISITO PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL

DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

APROBADA POR:

PRESIDENTE	:	
	:	Dr. CEFERINO UBERTO OLARTE DAZA
1er MIEMBRO	:	
	:	Dr. LUIS VICENTE OLIVERA MAROCHO
2do. MIEMBRO	:	
	:	Mg. JESUS MARTIN URVIOLA SANCHEZ
DIRECTOR DE TESIS	:	
	:	Dr. GUIDO MANUEL PEREZ DURAND
ASESOR	:	
	:	M.Sc. HUGO WENCESLAO DEZA CALSIN
ASESOR	:	
	:	M.Sc. URI HAROLD PEREZ GUERRA

PUNO – PERÚ
2014

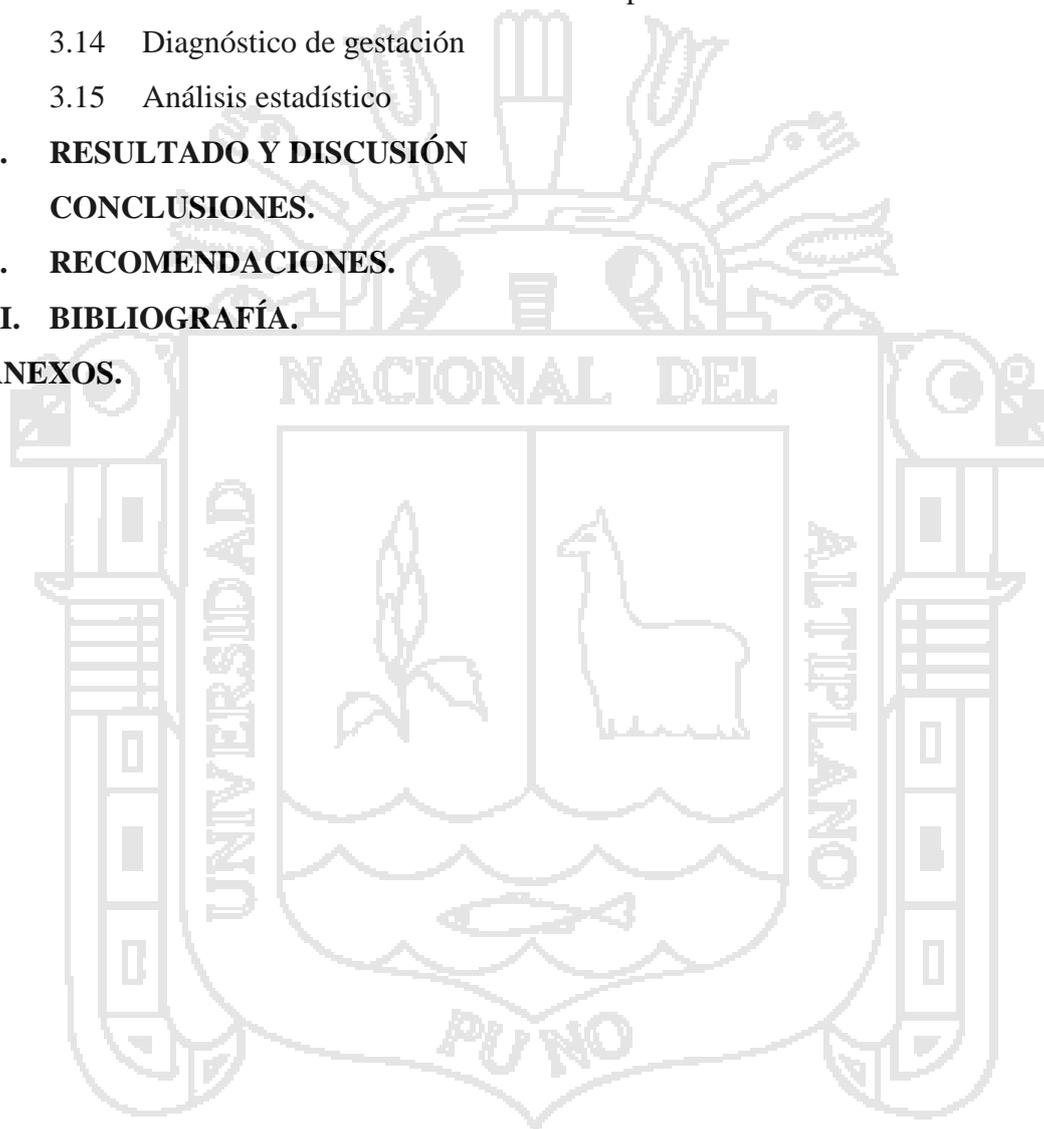
ÁREA : Reproducción animal

TEMA : Conservación de gametos

ÍNDICE

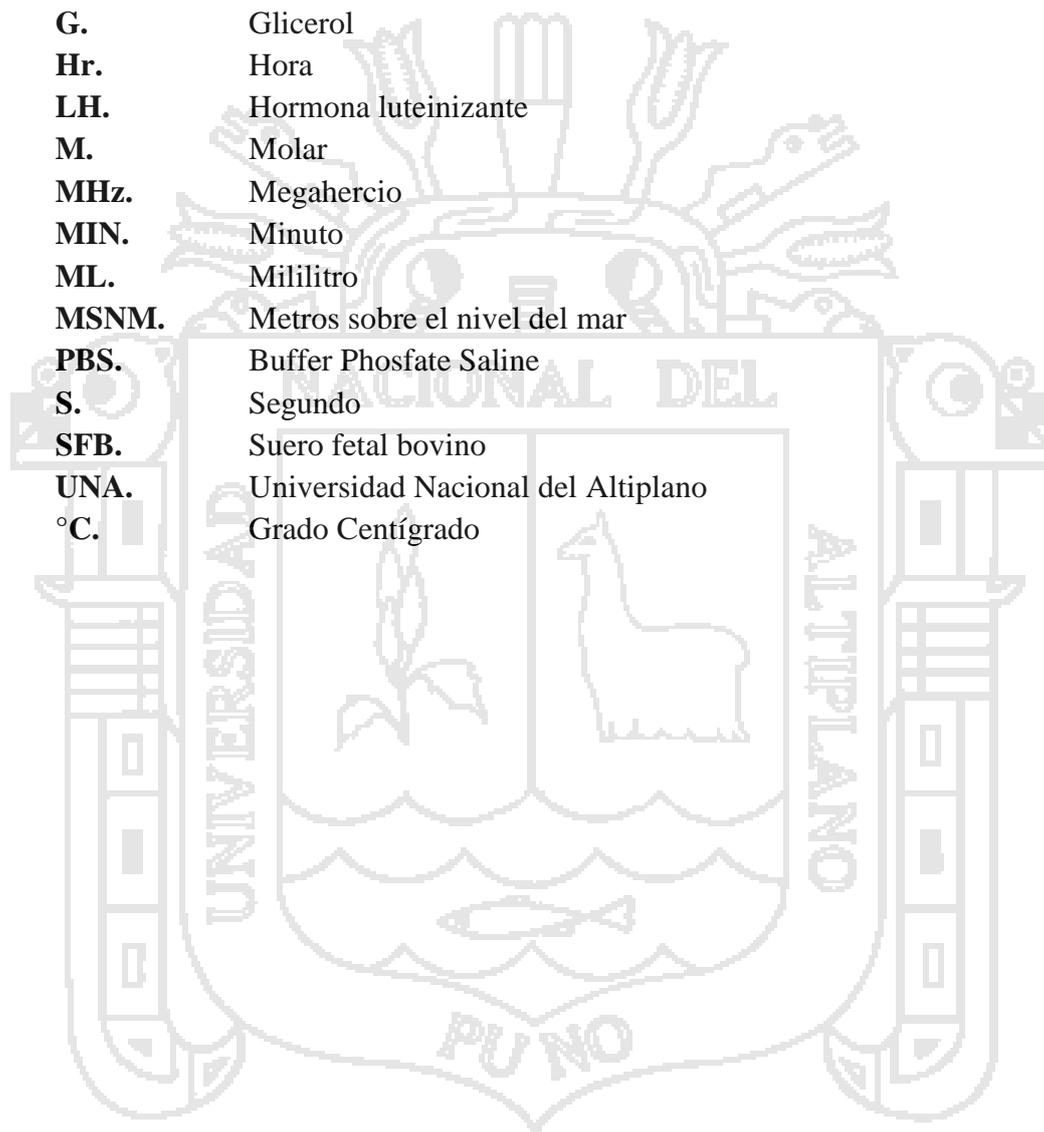
	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.	3
II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.	5
2.1. Desarrollo folicular y ovulación	5
2.2. Embriología del Camélido	6
2.2.1 Desarrollo embrionario	6
2.2.2 Recolección de embriones	7
2.2.3 Evaluación de embriones	7
2.3. Criopreservación de embriones	9
2.4. Crioprotectores	9
2.4.1. Crioprotectores permeables	10
2.4.2. Crioprotectores no permeables	11
2.5. Congelación estándar	11
2.6. Congelación de embriones de Camélidos	13
2.7. Descongelación de embriones	14
2.8. Evaluación post descongelación de embriones	15
2.9. Transferencia de embriones	16
2.10. Diagnóstico de gestación	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS.	17
3.1. Lugar	17
3.2. Animales.	17
3.3. Cópula	18
3.4. Manejo de donadoras y receptoras	18
3.5. Ecografía	18
3.6. Medio de Lavado	18
3.7. Recolección de embriones	19
3.7.1 Búsqueda de embriones	19
3.7.2 Evaluación de Embriones	20
3.7.3 Embriones	20
3.8. Crioprotectores	21
3.9. Medio de rehidratación	21

3.10	Congelación de embriones	21
3.10.1	Empajillado	21
3.10.2	Congelación de embriones	22
3.11	Descongelación de embriones	22
3.11.1	Evaluación de los embriones post-descongelación	22
3.12	Inducción de ovulación a receptoras	23
3.13	Transferencia de embriones a las receptoras	23
3.14	Diagnóstico de gestación	23
3.15	Análisis estadístico	24
IV.	RESULTADO Y DISCUSIÓN	25
V	CONCLUSIONES.	32
VI.	RECOMENDACIONES.	33
VII.	BIBLIOGRAFÍA.	34
ANEXOS.		42



ABREVIATURAS

CIP.	Centro de Investigación y Producción
CSA.	Camélido sudamericano
DMSO.	DimetilSulfoxido
EITS.	Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones
EG.	Etilenglicol
G.	Glicerol
Hr.	Hora
LH.	Hormona luteinizante
M.	Molar
MHz.	Megahercio
MIN.	Minuto
ML.	Mililitro
MSNM.	Metros sobre el nivel del mar
PBS.	Buffer Phosphate Saline
S.	Segundo
SFB.	Suero fetal bovino
UNA.	Universidad Nacional del Altiplano
°C.	Grado Centígrado



“Vencerse a uno mismo, tiene más valor que vencer al resto”

DEDICATORIA

A mi Madre Felicitas, porque me dio lo más valioso para todo ser humano Vida, Amor, Educación y Valores, gracias a tus ejemplos de superación y perseverancia puedo ver alcanzada esta meta.

A mis hermanos Ronal Mijail, Yanet y Juana, porque siempre estuvieron cuando los necesité y porque son el motivo de todo mi alegría y felicidad.

A mis amigos, José Enrique Zea Velasquez y Jhonny Vera Flores, por todo su apoyo incondicional “Dicen que un amigo es el hermano que Dios olvidó darnos” estoy convencido de que es así.

A la mujer que sin saberlo, siempre fue el motor de mis esfuerzos y mis ganas de superación Sandra Evelin Córdova Vargas.

En memoria a Yodis Edwar Quispe Collantes, quienes tuvimos la oportunidad de conocerlo sabemos que fue un tipazo, siempre optimista, con buen humor, colaborador, emprendedor. Tuve la dicha de conocerte y el honor de contar con tu apoyo, gracias Yodis.

Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, comprensión y consejos. A todos, espero no defraudarlos y quiero contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

AGRADECIMIENTOS

- *A mi maestro y director de Tesis Dr. Guido Manuel Perez Durand, por sus sabios consejos, comprensión y guía incondicional.*
- *A Mg. Sc. Hugo W. Deza Calsin, mi maestro y asesor, por sus enseñanzas, por su apoyo constante en mi etapa estudiantil y en la ejecución de esta Tesis. Por haberme dado la oportunidad de desarrollarme profesionalmente.*
- *A Mg. Sc. Harold Pérez Guerra, por su apoyo y amistad.*
- *A Mg. Joel Pacheco Curie, mi maestro y amigo, por su confianza y buenos deseos.*
- *A los miembros del jurado revisor Dr. Ceferino Uberto Olarte Daza, Dr. Luis Vicente Olivera Marochó, Mg. Jesús Martín Urviola Sánchez y Mg. Sc. Faustino Quispe Condori, por sus aportes y correcciones realizadas a este trabajo de investigación.*
- *Y a todos mis amigos, que siempre estuvieron al pendiente de la culminación de ésta Tesis.*

RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó en el Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla de la Universidad Nacional del Altiplano Puno, se utilizó 32 hembras donadoras y 24 receptoras, con experiencia de último parto, de buena condición corporal, clínicamente sanas, y de buena amplitud de isquiones. Los objetivos fueron, 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. Se aparearon a las donadoras con machos fértiles y a las receptoras con machos vasectomizados, al 8° día post cópula, se realizó la ecografía y la recolección de embriones, utilizando Suero Fisiológico + 10% de suero fetal bovino. Los embriones clasificados como de grado I y II, fueron los seleccionados para ser congelados. En número de 12 embriones con Etilenglicol 1.5M y 12 con Dimetilsulfóxido 1.0M, fueron expuestos por 10 min como máximo a sustancia crioprotectora, luego fueron aspirados en pajuelas de 0.25 ml. El congelador manual se calibró a -6°C , se cargaron las pajuelas cuando este marcaba -7°C se mantuvo por lapso de 1min para luego realizar el sembrado de núcleos de congelación, con una pinza metálica previamente enfriada en nitrógeno líquido, luego de 10min inició el descenso de temperatura a una velocidad de $0.5-1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta -33 ó -35°C y se sumergió en nitrógeno líquido. Para la descongelación la pajuela se mantuvo 8 segundos a temperatura ambiente y luego se sumergió en baño María a 32°C por 2 min. Se vació el contenido en placa Petri para su rehidratación en medio de mantenimiento + sucrosa 0.2M por 5 min. Se obtuvieron (12/12) 100% de embriones sobrevivientes a la congelación con etilenglicol, frente a (8/12) 66.7% logrado con Dimetilsulfóxido, ($p \geq 0.05$). Hecha la transferencia a las receptoras, el diagnóstico de gestación se realizó entre los días 50-60 post transferencia por ecografía de los cuales se obtuvieron (7/12)

58.3% de embriones viables para los congelados con etilenglicol y (3/8) 37.5% para los congelados usando Dimetilsulfóxido, no encontrándose diferencia significativa ($p \geq 0.05$). Concluyendo, que los embriones de alpaca congelados con Etilenglicol por el método estándar no son estadísticamente diferentes tanto en sobrevivencia como en viabilidad a los congelados con Dimetilsulfóxido.



I. INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos son animales muy importantes en la economía andina; son fuente de carne, fibra y trabajo para la gente, especialmente aquella que habita las regiones más elevadas de los andes. Estos animales utilizan extensas regiones que debido a factores asociados a la altitud, no podrían ser aprovechadas de manera efectiva por otros animales domésticos. Burfening P. citado por (Novoa y Florez, 1991). La población de alpacas en la región Puno es de 1'459.903, representando este el 39.6% de la población nacional (IV CENAGRO, 2012). Es necesario además saber que superamos en número de animales, largamente a nuestros países vecinos Bolivia, Chile, Argentina (Brack, 2003).

Existen en el mundo dos sistemas de producción de camélidos sudamericanos (CSA). La primera es el pastoreo estratégico tradicional de los Andes, con una escasa pastura en el seco altiplano andino llamado Puna, con un pastizal de altura entre 3800 y 4800 msnm. presión atmosférica baja, ambiente seco y a menudo con viento. El segundo sistema opera en condiciones más favorables, a poca altura (no más de 800 msnm.), en ambos sistemas, la selección de calidad de la fibra ha sido el principal objetivo de investigación y programas de desarrollo. Muchos proyectos han ido centrándose en el mejoramiento del hato a través de la selección y la introducción de machos superiores con excelente calidad de fibra (médula y color) (Miragaya *et al.*, 2005). La explotación de camélidos sudamericanos es de gran importancia social, para la población nativa de los altos andes, la fisiología reproductiva de estas especies representa un desafío en el desarrollo de técnicas de crianza más avanzadas. Actualmente en la criopreservación de embriones no se han desarrollado muchas investigaciones que tengan buenos resultados (Aller y Rebuffi 2002).

Durante los últimos 6 años, la mejora y simplificación de las técnicas de criopreservación de embriones ha permitido el almacenamiento congelado de embriones, de un gran número de especies, convirtiéndose en rutina en los programas comerciales de transferencia de embriones. En la mayoría de los casos, los protocolos convencionales de congelación lenta se siguen utilizando y las tasas de preñez de embriones en bovino y equino alcanzan un 50-60% (Niemann, 1991; Lascombes y Pashen, 2000).

La transferencia de embriones frescos o congelados es usada hace varios años de manera muy eficiente en ovinos, bovinos, teniendo como consecuencia la mejora genética de estas especies incrementando sus parámetros productivos. En las alpacas también es factible el uso de esta biotecnología.

Este trabajo de investigación se propuso congelar/descongelar embriones, contribuyendo a las investigaciones en este tema y lograr en un futuro la difusión de animales con elevado valor genético.

Este trabajo se planteó como objetivos: Evaluar la sobrevivencia de embriones, posterior a la congelación/descongelación, con dos crioprotectores y Determinar la viabilidad de embriones post congelación/descongelación, en las receptoras.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Desarrollo folicular y ovulación

Las hembras de las especies domésticas nacen con un número determinado de ovocitos y folículos ováricos, gran parte de los cuales sufrirán atresia y nunca serán ovulados. A lo largo de la vida de la hembra, los folículos primordiales permanecen en un estado de reposo y cada cierto tiempo algunos son seleccionados para desarrollarse. El desarrollo folicular es un proceso continuo que culmina con la ovulación del folículo madurado o con la regresión del mismo (Galina y Valencia, 2008).

La dinámica folicular de la llama sigue el patrón clásico de ondas descrito en la hembra bovina. En cada onda folicular, emerge un grupo de folículos, uno de los cuales (el folículo dominante) continuará su crecimiento hasta alcanzar el diámetro máximo de 9-16 mm. La acción inhibitoria del folículo dominante lleva al resto de los folículos de la misma cohorte (subordinados) a detener su crecimiento y atresarse. Entre 1 y 4 días de comenzada la regresión del folículo dominante emerge la onda (Adams *et al.*, 1990; Bravo *et al.*, 1990).

En el crecimiento folicular intervienen la proliferación y la diferenciación inducidas por hormonas de células de la teca y de la granulosa, lo que finalmente causa un incremento en la capacidad de los folículos de producir estradiol y de reaccionar a las gonadotropinas. La producción de estradiol determina cuál folículo adquirirá los receptores de LH necesarios para la ovulación y luteinización. Las perturbaciones en la respuesta de la granulosa y teca a las señales gonadotrópicas interrumpen el crecimiento folicular e inician la atresia (Hafez, 2000).

En camélidos el estímulo para la descarga de la hormona luteinizante y la subsiguiente ovulación es la introducción del pene, el estímulo de la monta sola sin la introducción del pene, resulta en una baja tasa de ovulación (Fernández-Baca *et al.*, 1970). Periodos de monta por un tiempo de 5 minutos como mínimo es suficiente para la inducción de la ovulación en alpacas, esto en presencia de un folículo preovulatorio, así mismo se reporta un 5% de ovulaciones espontáneas cuando la hembra es aislada del macho y luego se la presenta ante este (Bravo, 2002; Sumar, 2000).

2.2 Embriología del camélido

2.2.1. Desarrollo embrionario

Las divisiones a partir del cigoto comienzan durante el transporte del embrión a través del oviducto hasta entrar en el útero, pero, el tiempo en el que ocurre este es específico a cada especie. Después de algunas divisiones celulares, el embrión toma forma de una pelota pequeña de células llamada mórula, luego de ello estas células se ordenan de modo tal que forman una cavidad llena de líquido entonces se denomina blastocisto (Hyttel *et al.*, 2010).

Tabla 1. Tiempo de pasaje del embrión desde el oviducto hasta el útero y formación del blastocisto 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 ½	8-16 células	7-8
Oveja	3	8-16 células	6-7
Yegua	5-6	Mórula	6
Perra	8	Blastocisto	8

(Hyttel *et al.*, 2010).

En el desarrollo embrionario de alpacas se tiene a los 6 días post monta mórula. 8 días blastocisto joven y blastocisto expandido 10 días, vesícula embrionaria (Perez, 1995).

2.2.2 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 la cervix con una sonda Foley y por el recto con mano enguantada se ayuda a dicha manipulación. Una vez insertada la sonda en el cuerno uterino se llena el balón con 30-40 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 en filtro colector, lavado que debe repetirse por lo menos tres veces con un mínimo de 500 ml (Skidmore, 2000; Huanca *et al.*, 2004).

2.2.3. Evaluación de embriones

La clasificación de los embriones se realiza en base a su aspecto morfológico. Una fina pipeta de vidrio permitirá mover los embriones, para poder observarlos desde distintos ángulos (Hafez, 2000; Palomino, 2000). Se debe observar la integridad de la membrana pelúcida y su esfericidad (Palomino, 2000). El embrión debe de tener un desarrollo acorde con el día de colecta; se tolera un máximo de 48 hr de retraso (Hafez, 2000). En el día 6to o 7mo, se deben descartar los embriones de menos de 32 células, las células deben ser claras y de contorno regular, siendo la opacidad signo de degeneración, este tipo de examen morfológico no constituye un test absoluto de la viabilidad embrionaria. Sin embargo se presentan diferencias significativas en el

porcentaje de preñez cuando se transfieren embriones de calidad media respecto a la calidad buena o excelente (Hafez, 2000; Palomino, 2000; Witenberg *et al.*, 1987).

(IETS, 1998) La Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones, propone una tabla de calificación.

Tabla 2. Calificación de embriones propuesta por la IETS.

CALIDAD	CARACTERISTICAS
EXCELENTE BUENO	Embrión acorde a su recuperación, esférico, simétrico, con células de tamaño, color y textura uniforme. Se congela con muy buenos resultados
REGULAR	Poca variación, algunos fragmentos celulares en espacio perivitelino o pequeñas vesículas en los blastómeros
POBRE	Severos problemas, numerosos blastómeros extraídos, células degeneradas, células de diversos tamaños. Generalmente los embriones son no transferibles, no deben ser congelados
DEGENERADO	Blastómeros desorganizados, las células tienen muchas vesículas y gránulos. Embrión no transferible

Skidmore *et al.* (2004), propone una tabla de calificación para embriones de camélidos.

Tabla3. Clasificación de embriones de camellos propuesta por Skidmore.

GRADO DEL EMBRIÓN	CARACTERISTICAS
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 con manchas negras, contorno irregular y algunas células protruidas.

GRADO IV	Embrión colapsado, exponiendo áreas oscuras degeneradas y muchas células sobresalientes.
GRADO V	Embriones muy oscuros, colapsados, fragmentados, no transferibles.

(Skidmore *et. al.*, 2004).

2.3. Criopreservación de embriones

La criopreservación posibilita almacenar embriones de una amplia variedad de especies mamíferas sin que pierdan su capacidad de desarrollar y nacer vivos. En la actualidad, los embriones son congelados y descongelados de manera rápida. Esto hace necesario deshidratarlos parcialmente antes de la congelación a fin de evitar la formación de cristales que lesionan los blastómeros (Mazur, 1977).

Al conservar células a temperaturas extremadamente bajas (-196 °C) es posible detener por completo la actividad enzimática, la respiración celular, el metabolismo, el crecimiento, la multiplicación, etc., es decir, es posible mantener células durante un largo periodo de tiempo sin afectar su viabilidad, ni causar cambios genéticos (Schneider y Mazur, 1984; Gordon, 1994; Tanaka *et al.*, 1997; Leibo 1989).

2.4 Crioprotectores

Los crioprotectores se clasifican, desde el punto de vista farmacológico, como drogas de acción inespecífica que permite a las células sobrevivir a la congelación del agua a través de diferentes mecanismos, es decir, no consiguen su efecto actuando directamente sobre receptores, enzimas o genes específicos. Entre los diferentes crioprotectores, citar los alcoholes, las aminas, los azúcares, las sales inorgánicas y las macromoléculas. A pesar de su variada naturaleza química, todos los crioprotectores

son solubles en medios acuosos y tienen capacidad de formar puentes de hidrógeno (Karrow, 1997).

Los crioprotectores tratan de evitar los daños causados por la congelación, para conseguir este objetivo, actúan básicamente sobre dos aspectos de la congelación:

- a) Sobre la formación de cristales de hielo, puesto que inicialmente disminuyen la temperatura a la cual se forma los núcleos de hielo (de 0 °C a -4/-5 °C), es decir, favorecen la formación de agua “superfria” sin que se inicie la formación de cristales de hielo.
- b) Sobre la deshidratación de la célula, debido a su elevada osmolaridad. Esta deshidratación también previene la formación de cristales de hielo intracelulares (Karrow, 1997).

2.4.1. Crioprotectores permeables.

Estos crioprotectores debido a que tienen un peso molecular bajo, son capaces de atravesar la membrana plasmática de forma activa o pasiva. Entre estos se encuentran los alcoholes como el glicerol, el etilenglicol, 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). De todos, el Etilenglicol es el crioprotector más permeable usado ampliamente para la conservación de embriones y ovocitos debido a su baja toxicidad celular (Kasai *et al.*, 1992; Ali y Shelton, 1993; Kasai, 1996). Y a su rápida capacidad de difusión a través de la membrana plasmática (Emiliani *et al.*, 2000).

2.4.2. Crioprotectores no permeables

Estos no son capaces de atravesar la membrana plasmática debido a su elevado peso molecular y a su compleja estructura. Además, no presentan efecto crioprotector por sí solos. Su principal función crioprotectora es de elevar la presión osmótica, disminuyendo, de esta forma, la cantidad requerida de crioprotector permeable y su toxicidad y favoreciendo así la deshidratación de la célula (Shaw *et al.*, 1997). Dentro de este grupo se encuentran los azúcares tales como la glucosa, la fructosa, la sacarosa, la trealosa, la lactosa y la polivinilpirrolidona. Estas macromoléculas son capaces de extraer el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica pero sin penetrar en la célula. Estas moléculas son capaces de encapsular al ovocito o embrión en una matriz viscosa previniendo la cristalización intracelular durante la descongelación (Kuleshova *et al.*, 1999). Son efectivos para preservar la funcionalidad y estructura de las membranas a baja actividad de agua; deshidratan junto con el crioprotector las células de los embriones durante el equilibrio (Sommerfeld y Nieman, 1999). Actúan además como tampón osmótico al reducir el choque osmótico que podría resultar de la dilución del crioprotector (Liebermann *et al.*, 2002).

2.5. Congelación estándar

El método de congelación estándar posibilitó a Wilmot y Rowson (1973) obtener el primer ternero nacido de la transferencia de un embrión congelado. Al método estándar se le han efectuado desde entonces distintas modificaciones tendientes a su simplificación (Cabodevila *et al.*, 1991).

En el método de congelación estándar los embriones alcanzan su equilibrio osmótico antes de comenzar el descenso de la temperatura y este se mantiene durante el enfriamiento (Cabodevila y Teruel 2001). La exposición de los embriones al medio

de congelación (PBS + G) debe realizarse a temperatura ambiente (20 - 22 °C), en un solo paso, de 10 a 30 min de duración para iniciar con la equilibración del crioprotector con el embrión (Chupin y Procureur, 1984; Niemann, 1991). Este período incluye el envasado de los embriones en pajuelas plásticas. Esto permite realizar más rápidamente y con mayor precisión la inducción de la cristalización o “seeding” (Maurer, 1978). Las pajillas deben ser colocadas en un equipo de congelación a -7 °C durante 5 min para equilibrar la temperatura de las pajillas con la del equipo; el seeding se realiza poniendo en contacto la superficie de la pajilla con una placa metálica enfriada con nitrógeno líquido (para inducir a la formación de núcleos de hielo); el agente refrigerante del equipo puede ser nitrógeno líquido alcohol o etanol enfriado por medio de un compresor. El no inducir la cristalización conduce a la formación de cristales de hielo bajo un estado de súper enfriamiento y a una elevación repentina de temperatura (se genera calor latente de -10° - -15 °C), resultando un severo trauma físico que puede dañar las células (Niemann, 1995). Una vez efectuado el “seeding”, se mantiene la temperatura estable durante 10 min (período de estabilización) que sirve para evitar que el hielo sembrado se descongele y luego se desciende a una velocidad de entre 0.1 y 0.5 °C hasta -30 ó -35 °C para establecer un adecuado balance entre deshidratación y formación de hielo intracelular, en este momento las pajillas pueden ser retiradas del equipo de congelación y sumergidas en nitrógeno líquido (Lehnjensen y Greve, 1982). La descongelación se realiza de manera rápida, sumergiendo las pajuelas en baño María a 30 ó 35 °C durante 20–30 s (Chupin, 1986).

Convencionalmente embriones y ovocitos son congelados con procedimientos de congelación lenta, durante estos procedimientos las células son expuestas a una baja concentración de crioprotectores como, glicerol, etilenglicol, dimetilsulfoxido y otros por 5-15 min. Y congelados lentamente (generalmente a una tasa de 0.3-0.5 °C/min.)

hasta una temperatura intermedia generalmente hasta -35°C y luego son sumergidas en nitrógeno líquido para su almacenamiento (Leibo y Songsasen 2002).

Contrariamente a lo que comúnmente se cree, el mayor desafío que las células deben soportar durante la crioconservación no es el causado por el almacenamiento a bajas temperaturas, sino la letalidad de una zona intermedia de temperatura ($+15$ a -5°C), intervalo por el cual las células deben pasar dos veces (Mazur, 1963).

2.6. Congelación de embriones en camélidos

Se criopreservaron embriones de llama por el método de congelación lenta con (10% etilenglicol + 10% SFB + 50 m/ml de gentamicina) a 26°C durante 5 min y envasados en pajuelas de 0.25 ml. El descenso de temperatura se realizó a una tasa de $0.12^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en 3 horas, luego a 5°C hasta -20°C , y finalmente se sumergieron las pajuelas en el nitrógeno líquido. Y producto de este proceso se lograron 62% de sobrevivencia y un 0% de viabilidad en receptoras al día 14 y 24 post transferencia (Huanca *et al.*, 2011).

Probaron la congelación estándar en embriones de Camellos Bactrianos: 158 embriones fueron asignados en tres grupos, los cuales fueron expuestos a 1,5 M etanediol, por 10 min ($n=67$), 5 min ($n=51$) y 1 min ($n=40$), luego congelados. Posteriormente descongelados y rehidratados en medio tamponado con HEPES lactato de sodio. La tasa de supervivencia de los embriones a la descongelación fue alta (91%), estos fueron calificados según su aspecto morfológico, esta tasa se redujo en gran medida después de 2 h de cultivo (59%). 92 embriones se transfirieron a camellos receptores resultantes en 18 fetos viables (Skidmore and Loskutoff, 1999).

Existe un reporte de embriones de dromedarios crioconservados por el método convencional con resultados de preñez relativamente bajo 32% (Nowshari and Saleem,

2005). Por otro lado, Skidmore congeló embriones de camellos utilizando el protocolo de congelación convencional con etanediol a 1.5 M exponiendo a 1, 5 y 10 min de equilibración, a la descongelación utilizaron 0.2 M de sacarosa para la rehidratación con tiempos de 5 y 10 min, obteniendo el mejor resultado a la transferencia de embriones el 37% de fetos al diagnóstico de gestación a los 27 y 32 días a la ecografía, en el tratamiento de 10 min de exposición al crioprotector y a la rehidratación por 5 min (Skidmore *et al.*, 2004).

Recientemente estudiaron los diferentes métodos de congelación de embriones de camellos sobre la integridad de citoesqueleto del embrión y como resultado, reportaron, los embriones de 6 días de edad sometidos a congelación convencional con 1.5 M de etanediol y rehidratados con 0.2 M de sacarosa por 5 min soportan más al stress de congelación frente a embriones vitrificados. Logrando, el 10% embriones de categoría A y el 90% de embriones de categoría B sometidos a congelación lenta frente al 10% de embriones de categoría A, 10 % de categoría B y 50% de embriones de categoría C sometidos a vitrificación (Skidmore *et al.*, 2009).

2.7. Descongelación de embriones

El proceso de descongelación o calentamiento de las pajillas que contienen los embriones criopreservados, está afectado por el procedimiento utilizado en el congelamiento (Palomino, 2000). La descongelación debe efectuarse de manera rápida para impedir el crecimiento de los cristales de hielo desarrollados durante la congelación (Lehn-Tensen y Rall, 1983). Asimismo, un descongelamiento lento otorga el tiempo suficiente como para permitir la descongelación extra e intra citoplásmica lo que puede conducir a una baja sobrevivencia post-criopreservación y para evitar ello las

pajuelas son retiradas del Nitrógeno líquido e introducidas en baño María a 30°C aproximadamente (Rall y Polge, 1984).

Las pajuelas se extraen del tanque de nitrógeno, son mantenidas al ambiente por 10s y son colocadas a 37 °C por 1 min. Y luego puestas en soluciones de sucrosa al 0.25 M y 0.12 M (Huanca *et al.*, 2011).

La descongelación se efectúa de manera rápida, sumergiendo las pajuelas en un baño María a 30-35 °C durante 20-30 S (Cabodevila *et al.*, 1991). Pero se informó, que exponiendo las pajuelas al aire a 20 °C durante 10 s antes de colocarlas en baño María, disminuye el número de embriones que sufren ruptura de la zona pelúcida (Rall y Meyer, 1989).

Rall y Fahy (1985), observaron que los mayores porcentajes de sobrevida embrionaria se obtuvieron cuando el calentamiento se efectuó de modo rápido (2.500°C/minuto).

La extracción del glicerol puede efectuarse luego de retirar el embrión de la pajuela o dentro de la misma. En el primer caso, se la lleva 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). En la elección de una de estas opciones generalmente prima el criterio personal dado que cada una de ellas tiene ventajas relativas. El embrión descongelado es evaluado morfológicamente para eliminar aquellos con daños provocados por los procedimientos utilizados. Con esta técnica de extracción del glicerol se obtienen porcentajes de preñez que generalmente superan el 50% (Niemann, 1985).

2.8. Evaluación post-descongelación de embriones

Los embriones después de descongelarse y rehidratarse deben evaluarse, para descartar aquellos que sufrieron daños que imposibilitarían su viabilidad in vivo o in

vitro (Cabodevila *et al.*, 1991; Palomino, 2000). Solo serán transferidos los embriones de grado I y grado II, por sufrir estos menos lesiones durante el proceso de congelación/descongelación (Niemann, 1985; IETS, 1998).

2.9. Transferencia de embriones

La transferencia de embriones se hace por el método no quirúrgico (Skidmore, 2000). Para la transferencia, los embriones se colocan en pajuelas de 0.25 ml y se depositan en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo (Huanca *et al.*, 2011). Esta pajilla es cargada en la pistola de inseminación que se usa para la inseminación artificial de vacunos (Palomino, 2000).

2.10. Diagnóstico de gestación

El diagnóstico de gestación se realiza por ecografía (trans-rectal) a los 14 - 24 días después de la transferencia, determinándose la presencia o ausencia de vesícula embrionaria (Huanca *et al.*, 2011).

III. MATERIAL Y METODOS

3.1 Lugar

El presente trabajo de investigación se realizó en el Megalaboratorio de transferencia de embriones y criopreservación, del Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno; ubicado a una altitud de 3974 msnm, cuyas coordenadas son Longitud Oeste 70° 43' 50", Latitud Sur 14° 43' 35". Políticamente ubicado en el Distrito de Umachiri, Provincia de Melgar de la Región Puno, a 18 Km. de la ciudad de Ayaviri.

Con el siguiente registro termo pluviométrico para el mes febrero: una media de la temperatura máxima de 15.1°C. El promedio de las temperaturas mínimas fue de 4.4°C. La oscilación térmica de las temperaturas medias fue de 10.7°C. Las precipitaciones registraron un acumulado total mensual de 164.1 lt/m² (SENAMHI, 2011).

El trabajo se realizó entre los meses de Febrero a Abril.

3.2. Animales

Se utilizaron:

- 32 alpacas, como donadoras.
- 24 alpacas, como receptoras.

Fueron escogidas hembras de 4-5 años de edad, clínicamente sanas con experiencia de parto en el último año, de buena condición corporal, de buena amplitud de isquiones para la manipulación rectal.

- Se utilizó 5 alpacas machos reproductores, para la monta a las donadoras.
- Dos machos vasectomizados para la inducción de ovulación de las receptoras.

3.3 Cópula

- La cópula se realizó asignando a cada hembra donadora un macho, por un tiempo de 15 a 25 min.
- Cada hembra fue marcada con pintura de color, se anotó número de arete (Anexo 1).

3.4. Manejo de donadoras y receptoras

- Al séptimo día de haberse producido la cópula se llevó a donadoras y receptoras al Megalaboratorio, para mantenerlas en ayunas aproximadamente 15-17 horas.

3.5. Ecografía:

La ecografía de las donadoras y receptoras se realizó al octavo día post-cópula.

Procedimiento:

- Se sujetó con cuerdas en posición cubito ventral, seguido se evacuarón las heces del recto y se higienizó la zona perineal.
- Se usó ecógrafo de marca Sonovet 600 con transductor lineal de 7.0 MHz.
- Seguido se realizó la ecografía de los ovarios izquierdo y derecho para determinar la presencia de cuerpo lúteo en las donadoras e iniciar con el lavado y en las receptoras para hacer la transferencia post-descongelación.

3.6. Medio de lavado:

Suero fisiológico a 35-37 °C, adicionado con 10% de suero fetal bovino.

3.7.Recolección de embriones:

Los embriones fueron recolectados por el método no-quirúrgico al octavo día post-copula.

- Se introdujo la mano izquierda enguantada y lubricada por el ano para ubicar la cérvix.
- Con la ayuda de la guía para inseminación artificial se introdujo la sonda Foley de dos vías para atravesar la cérvix y dirigirla hacia el cuerno cuyo ovario tiene el cuerpo lúteo.
- Ubicado el cuerno se ancló la sonda inflando el balón con 10 a 15 Ml de aire, luego se retiró la guía.
- Seguido se inyectó 4 ml de lidocaína al 2% vía epidural. Conectándose luego a la Sonda de doble vía en “Y” en un extremo al medio de lavado y por el otro al filtro colector de embriones.
- Se dejó entrar medio de lavado por gravedad, hasta sentir turgencia del cuerno uterino, momento en que se cerró el clip; luego se dejó salir el medio de lavado hacia el filtro colector, abriendo el respectivo clip, con la ayuda de suaves masajes.
- Este procedimiento se repitió por tres a cuatro veces, luego se extrajo el aire del balón para retirar la sonda Foley.

3.7.1. Búsqueda de embriones:

- Se dejó aproximadamente 10 mL del contenido total del filtro. Este se vació en una placa petri temperada a 25 °C y de base cuadrículada. Es importante enjuagar el interior del filtro para evitar la adhesión del embrión en las paredes.

- La búsqueda se hizo con estereoscopio a 20X de aumento, localizados los embriones se trasladaron a otra placa la cual contenía gotas de medio de mantenimiento, se lavó los embriones hasta por 8 veces.

3.7.2. Evaluación de los embriones

- Se evaluaron, 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 3.
- Se escogieron solo embriones de Grado I, II. Estos fueron aspirados individualmente a una pajuela de 0.25 mL con medio de mantenimiento y se mantuvo en platina térmica a 22°C, hasta el momento de su congelación.

3.7.3. Embriones

Se utilizaron 24 embriones de alpacas producto de ovulación única, recuperadas al 8vo día post-copula distribuidos de la siguiente forma:

Tabla 4. Distribución de embriones para la congelación

Congelación con Etilenglicol	Congelación con Dimetilsulfóxido
n =12 (embriones)	n =12 (embriones)

Se usaron embriones de grado I y II

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

(Skidmore *et. al.*, 2004).

3.8 Los crioprotectores

Etilenglicol 1.5 M.

- Se mezclaron 0.835 mL de Etilenglicol + 9.165 mL de medio de mantenimiento (PBS + 10% de suero fetal bovino). Luego se mantuvo refrigerado a 4°C, hasta su uso

Dimetilsulfóxido 1.0 M.

- Se mezclaron 0.84 mL de Dimetilsulfóxido + 9.16 mL de medio de mantenimiento (PBS + 10% de suero fetal bovino). Luego se mantuvo refrigerado a 4°C, hasta su uso.

3.9. Medio de rehidratación

Sucrosa 0.2 M

- Se disolvió 0.342 gr de sucrosa en 10 mL de medio de mantenimiento (PBS + 10% de suero fetal bovino) y se refrigeró a 4°C, hasta su uso.

3.10. Congelación de embriones

3.10.1. Empajillado

Los pasos fueron:

- Los embriones fueron expuestos a 3 mL de crioprotector dentro de una placa Petri, por un tiempo máximo de 10 min. Fueron aspirados rápidamente en pajillas de 0.25 mL en el siguiente orden:

Esquema N° 1 Armado de la pajilla, para congelación.

	Tapón de fabrica	Medio de Mantenim.	Aire	Embrión + Crioprotector	Aire	Medio de Mantenim.	Aire	Polivinilo de Cloruro
--	------------------	--------------------	------	-------------------------	------	--------------------	------	-----------------------

3.10.2. Congelación de embriones

La congelación fue de la siguiente manera:

- El congelador manual previamente fue enfriado en el cuello del termo de nitrógeno líquido, a -6°C controlado por el termómetro K Thermocouple, (Anexo 6)
- Las pajillas conteniendo los embriones, fueron colocadas en el congelador cuando este indicaba -7°C por un 1 min. Seguido, se realizó el “Seeding” por 13 s a nivel de las columnas de aire, con una pinza metálica previamente sumergida en nitrógeno líquido (Anexo 7). Seguido, se mantuvo a -7°C por 10 min.
- Luego, se procedió a congelar bajando la temperatura gradualmente de entre 0.5 a $1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta -33 ó -35°C . Finalmente, las pajillas se introdujeron al tanque de nitrógeno líquido.

3.11. Descongelación de los embriones

- Se extrajeron las pajillas del tanque de nitrógeno y se mantuvieron por 8s a temperatura ambiente. Seguido, se sumergieron en baño maría a 32°C por 2 min.
- Luego se vació el embrión dentro de una placa Petri, que contenía medio de mantenimiento más 0.2 M de sucrosa por 5 min.
- Se llevó al embrión a otra placa Petri que contenía únicamente medio de mantenimiento, para su evaluación (Anexo 8).

3.11.1. Evaluación de los embriones post-descongelación

Se realizó con la ayuda del estereoscopio sobre platina térmica, se observaron todas sus estructuras, poniendo especial atención en la zona pelúcida. Tomando como referencia de calificación los parámetros establecidos por Skidmore (cuadro N° 2)

3.12. Inducción de ovulación a receptoras

- Las receptoras fueron inducidas a ovulación mediante la cópula por 15 a 20 minutos con un macho vasectomizado el mismo día en el que las hembras donadoras fueron empadradas.

3.13. Transferencia de embriones a las receptoras

- Los embriones se cargaron dentro de una pajuela en la misma secuencia seguida para congelamiento, pero en este caso solo con medio de mantenimiento.
- Las receptoras fueron sujetadas de manera similar a las donadoras, se evacuaron las heces del recto se higienizó toda la zona perianal.
- Luego se introdujo la pistola de inseminación armada con la pajilla que contenía el embrión descongelado y con mucho cuidado se depositó el contenido en el cuerno izquierdo (Anexo 10).

3.14. Diagnóstico de gestación

El diagnóstico de preñez en las receptoras se realizó por ecografía entre los 50 y 60 días post-transferencia. Se consideró, embrión viable si en la receptora a la ecografía se visualizaba vesícula embrionaria con imagen anecoica y en la parte céntrica una imagen hipercoica.

3.15. Análisis estadístico

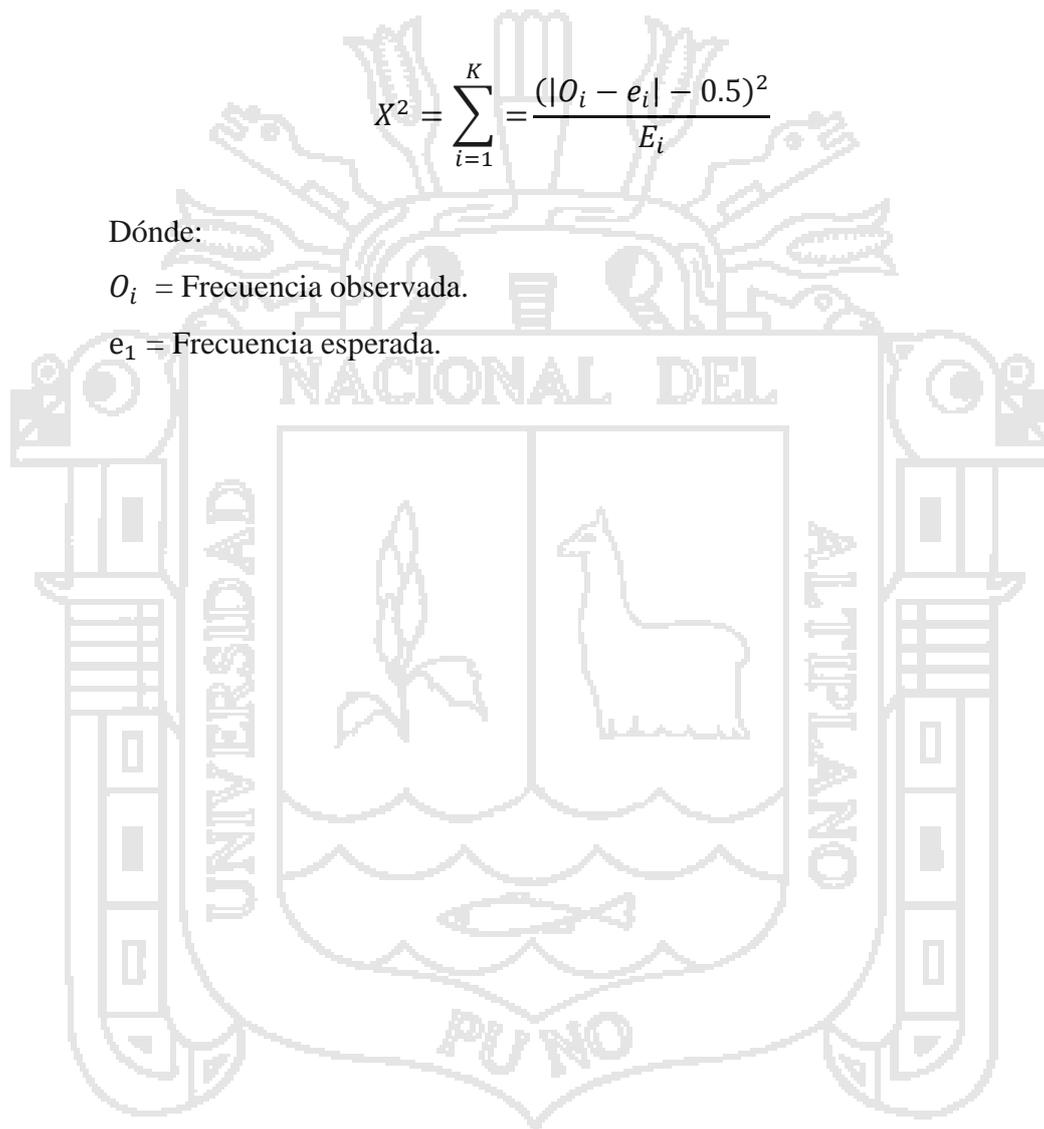
La sobrevivencia del embrión al proceso de congelación/descongelación y la viabilidad del mismo en la receptora, se evaluaron a través de la prueba de Chi cuadrado con corrección de Yates.

$$X^2 = \sum_{i=1}^K \frac{(|O_i - e_i| - 0.5)^2}{E_i}$$

Dónde:

O_i = Frecuencia observada.

e_1 = Frecuencia esperada.



IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Sobrevivencia de embriones a la congelación

Se consideró embriones sobrevivientes a todos aquellos embriones descongelados que tenían una forma perfectamente esférica y simétrica, con una zona pelúcida intacta sin daño aparente, con superficie lisa y uniforme, de color continuo y sin manchas oscuras en su superficie (Skidmore *et. al.*, 2004; IETS, 1998).

Tabla 5 Porcentaje de sobrevivencia embrionaria al proceso de congelación/descongelación

EMBRIONES	CRIOPROTECTORES	
	Etilenglicol	DMSO
Frescos	12	12
Descongelados	12	08
Sobrevivencia (%)	100%	66.7%

La tabla 5. muestra los resultados de sobrevivencia embrionaria al proceso de congelación-descongelación, donde los embriones congelados con Etilenglicol sobrevivieron al 100% y los congelados con Dimetilsulfóxido sobrevivieron en un 66.7%, estos resultados sometidos al análisis estadístico de Chi Cuadrado con corrección de Yates indican que, no existe diferencia estadística ($p \geq 0.05$).

Asimismo, se pudo observar que algunos de los embriones de Grado I y II, congelados con Etilenglicol, se descongelaron y se categorizaron en embriones de Grado III y IV. Similar a lo sucedido con embriones congelados con DMSO (Anexo 12).

El bajo porcentaje de sobrevivencia de los embriones congelados con Dimetilsulfóxido, se debería a la ligera toxicidad que este crioprotector produce en la zona pelúcida (Bouyssou y Chupin 1982), debido a su mayor peso molecular 78.13 g/mol, con respecto al Etilenglicol 62.07 g/mol, (Sigma Chemical), lo que explica el bajo índice de permeabilidad celular que tiene con respecto al Etilenglicol, por tanto la incapacidad de salir del interior del embrión con rapidez y así evitar daños post-descongelación. Es por ello destacar que el Etilenglicol se convirtió en un crioprotector de primera elección para la criopreservación de embriones (Skidmore and Loskutoff, 1999). Por otro lado, es importante indicar que no se consideró medir el tamaño de los embriones. Ya que, Hay una tasa de enfriamiento óptima para cada tipo de célula, esta depende del tamaño de la célula, su relación superficie/volumen, su permeabilidad al agua y el coeficiente de permeabilidad del crioprotector a determinadas temperaturas (Leibo, 1989; Schnaider y Mazur, 1984).

Los resultados del presente trabajo, con respecto al porcentaje (100%) de sobrevivencia de embriones de alpaca post-descongelación con etilenglicol 1.5 M, son superiores a los encontrados 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 pajuelas en nitrógeno líquido, esto ocasionó una entrada muy lenta de los crioprotectores permeables 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).

Respecto a la calidad de los embriones Huanca *et al.*, (2011) con 10% Etilenglicol, congelaron embriones 10/Grado I y 01/de Grado II, a la descongelación reporta, 4/Grado I y 7/Grado II, es decir disminuyeron su calidad en una relación de 6/11, similar a lo encontrado en el presente trabajo, para EG 3/12 y para DMSO 7/12. Skidmore (2009), observo un descenso en la calidad embrionaria post congelación-descongelación por el método lento con 10% de Etilenglicol, esta fue en una relación de 11/12. Este cambio de morfología, estaría dada porque, uno de los componentes celulares que a menudo se dañan durante la criopreservación es el citosqueleto (Dobrinsky *et al.*2000).

La sobrevivencia embrionaria, como la categorización post descongelación están directamente relacionadas a la formación de cristales de hielo intra y extracelular, que puede producirse 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. Por otro lado 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, esto puede producirse además, por un desequilibrio entre la concentración del crioprotector y la tasa de descenso térmico (Kasai *et al.*, 2002; 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 factor a considerar en la obtención de estos resultados es el hecho de que se usó un congelador manual.



4.2 Viabilidad de los embriones post descongelación

Se consideró embriones viables a todos aquellos embriones que luego de 50-60 días post-transferencia, muestra a la ecografía una vesícula embrionaria con imagen anecoica y en la parte céntrica una imagen hipercoica (Huanca *et al*, 2011).

Tabla 6. Embriones transferidos a receptoras y recetoras preñadas

OBSERVACIONES	CRIOPROTECTOR	
	Etilenglicol	DMSO
Embriones descongelados transferidos a las receptoras.	12	8
Receptoras preñadas	7	3
Viabilidad	58.3%	37.5%
Tasa de preñez (%)		

La tabla 6 muestra los resultados de la viabilidad de los embriones descongelados transferidos a las receptoras. Donde los embriones congelados con Etilenglicol tuvieron una viabilidad del 58.3% y los embriones congelados con Dimetilsulfoxido tuvieron un 37.5% de viabilidad, estos resultados sometidos a análisis de Chi Cuadrado con Corrección de Yates indican que, no existe diferencia estadística ($p \geq 0.05$).

Skidmore *et al.* (2004) reporta un 32% de viabilidad post-descongelación de embriones de Camellos Dromedarios expuestos de 1 a 10 min. a 1.5M de Etilenglicol. Estos resultados son inferiores a los encontrados en el presente trabajo, porque el tiempo de exposición al Etilenglicol es muy prolongado, este excesivo tiempo de contacto hace que el crioprotector altere el equilibrio osmótico y la membrana celular del embrión (Bouysson y Chupin 1982). De manera similar, Nowshari *et al.* (2005) reporta un 8% de viabilidad embrionaria con 7.0 M Etilenglicol. Las razones por las

cuales estos resultados difieren con los encontrados en el presente trabajo son, porque durante la criopreservación, las células son expuestas a mucho estrés, mecánico, térmico, y químico (Meryman, 1971), que comprometen las funciones celulares y la muerte de esta (Mazur *et al.*, 1972). Un hecho crucial para la viabilidad de los embriones, es que, las interrupciones más críticas a las funciones del núcleo celular se producen durante la deshidratación y congelación (Van Blerkom, 1989). Los daños celulares por congelación se influyen principalmente por la formación de cristales de hielo intracelular y el efecto solución, donde el primero es el principal responsable de la muerte celular por congelación, lo que se debe a la deshidratación inadecuada, y el segundo se produce por la separación de los cristales del agua pura del resto de la solución (Celestinos y Gatica, 2003).

Huanca *et al.*, (2011), reporta un 69% de preñez a la evaluación ecográfica a los 30 días post-transferencia de embriones frescos. Asimismo, Palomino *et al.*, (1996a; 1996b) obtuvo un 65% (13/20) de preñez por transferencia de embriones frescos en alpacas, por la vía transcervical, y por transferencia vía laparoscópica obtuvo un 100% (10/10) de preñez, respectivamente. Gatica *et al.*, (1994), reportó un 100% de preñez (1/1) en transferencia de embriones frescos en llamas, Palomino (2000). Asimismo Aller y Rebuffi (2002), realizó la transferencia de embriones frescos de llamas producto de superovulación encontrando una tasa de preñez de 33%. Estos resultados son superiores a los que se obtuvo en el presente trabajo para embriones congelados (58.3%) para EG, (37.5%) para DMSO.

Las razones exactas por las cuales se reduce la viabilidad de los embriones no están bien definidas pero es probable que se relacione al efecto osmótico directo o indirecto a la exposición de los agentes crioprotectores, al respecto estudios han determinado que la

exposición a algunos agentes crioprotectores, seguido de criopreservación reduce la sobrevivencia embrionaria mediante la interrupción irreversible de elementos del citoesqueleto como microfilamentos y microtubulos (Roche *et al.*, 1993) en embriones de vacunos, y en embriones de equinos (Tharasanit *et al.*, 2005).

Los datos obtenidos en el presente trabajo de investigación, nos demuestran que son viables los embriones transferidos post-descongelación, pero estos datos son muy variables lo que nos hace sugerir que la pérdida embrionaria se debe a factores ajenos a la transferencia. Ligadas al manejo adecuado de donantes y receptoras (Skidmore *et al.*, 2004). Las hembras receptoras no tuvieron un trato especial ni diferenciado estas estuvieron sometidas a un manejo común a hembras de majada general, haciendo largos recorridos antes y después de la transferencia de embriones, fueron desparasitadas con antiparasitarios orales y pasaron por la campaña de baños, estos pudieron ser determinantes en la obtención de los resultados que se obtuvieron. Un aspecto a considerar también, son las lesiones que se producen por efecto de los crioprotectores como el Dimetilsulfoxido y las temperaturas de congelación, los cuales causan lesiones en membrana, citoesqueleto y organelas celulares (Skidmore *et al.*, 2009). Los cuales no fueron motivo de estudio en este trabajo.

Estos aspectos de manejo indirectamente determinan el desarrollo embrionario en la receptora y por ende su viabilidad y se reflejan en los resultados obtenidos.

V. CONCLUSIONES

- Aplicando la congelación en embriones de alpaca se obtuvo la sobrevivencia del 100% de los embriones congelados con Etilenglicol, no existiendo diferencia estadística frente a los embriones congelados con Dimetilsulfóxido 66.7%, ($p \geq 0.05$).
- La viabilidad embrionaria post transferencia de embriones congelados con Etilenglicol fue 58.3% no existiendo diferencia estadística frente a los embriones congelados con Dimetilsulfóxido 37.5%. ($p \geq 0.05$).



VI. RECOMENDACIONES

- Congelar embriones de alpaca con el método estándar utilizando como crioprotector el Etilenglicol.
- Realizar un manejo adecuado de receptoras y donadoras.



VII. BIBLIOGRAFIA

- Adams G., J. Sumar y O. Ginther. 1990. Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). J. Reprod. Fert. 90, 353-545.
- Aller J. yG. Rebuffi. 2002. Successful transfer of vitrified llama (*Lama glama*) embryos. Anim Reprod Sc 73: 121-127.
- Ali J. y J. Shelton. 1993. Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. J. Reprod. Fert. 98(2):459-465
- Bouysson J., D. Chupin, 1982. Two step freezing of cattle blastocyst with dimethyl sulfoxide (dms) or glycerol. Theriogenology 17: 159-166.
- Brack, A., 2003. Los camélidos sudamericanos. [Consulta: octubre, 2012].
<http://ertic.inictel.net/biblioteca/texto/000020.pdf>.
- Bravo W., E. Fowler, H. Stabenfeldt, B. Lasley. 1990. Endocrine responses in the llama to copulation. Theriogenology 33:4, 891- 899.
- Bravo W. 2002 the reproductive process of south American camelids. Printed on acid-free paper in the united stated of America.
- Cabodevila J., R. Alberio, G. Palma, B. Iovannitti, y S. Torquati. 1991. Desarrollo "*in vitro*" e "*in vivo*" de embriones bovinos congelados utilizando un método estándar simplificado. Rev. Arg. Prod. Anim.
- Cabodevila J. y M. Teruel. 2001. Criopreservación de embriones bovinos. En: Palma a. biotecnología de la reproducción. Instituto nacional de tecnología agropecuaria, argentina, pp 149-174.

- Chupin D. and R. Procureur. 1984. Glicerol equilibration for deep freezing of cattle blastocysts: effect of number of steps and of total duration. *Theriogenology* 21: 230.
- Chupin D. 1986. Quick freezing of bovine blastocysts. *Theriogenology* 25: 219.
- Celestinos M. y R. Gatica. 2003. Vitricación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. *Arch. Med. Vet.* xxxiv, nº 2
- CENAGRO IV, 2012. Censo Nacional Agropecuario. Boletín02, MINAGRI
- Dobrinsky J., G. Pursel, C. Long and A. Johnson. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biology of Reproduction* 62 564–570.
- Emiliani S., V. Bergh, A. Vannin, J. Biramane, Y. Englert. 2000. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4 cell embryos and blastocysts. *Hum Reprod* 15(4):905-910.
- Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell DC, Hyttel P, Ward FA, Boland MP. 2001, Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Mol ReprodDev.* 58(2):186-95.
- Fernandez - Baca S., W.Hansel, C. Novoa.1970. Corpus luteum function in the alpaca. *Biol Reprod.* 3(2):252-61
- Galina C. y J. Valencia. 2008. Reproducción de animales domésticos. Tercera edición. Editorial Limusa. México.
- Gatica, R., M. Ratto, C. Schueler, M.A. Ortiz, J. Oltra y J. Correa. 1994. Cría obtenida en una llama (*Lama glama*) por transferencia de embriones, *Agríc. Tec.* 1: 66-71.
- Gordon I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. Ed. Cab International. UK.

- 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.
- Hyttel P., F. Sinowatz, M. Vejlsted. 2010. Essentials of domestic animal embryology. Sunders Elsevier Limited. cap. 6, pag. 68-70
- Horvath G. and J. Seidel. 2006. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl-beta-cyclodextrin. Theriogenology 66 1026–1033.
- Huanca W., T. Huanca, M. Ratto, A. Cordero, O. Cardenas, N. Apaza. 2004. Transferencia de embriones. Rev Estación Exp Illpa, Puno 3(8): 2-5.
- Huanca W., M. Vásquez, M. Cervantes, A. Cordero, O. Cárdenas y T. Huanca. 2007 vitrificación de embriones de alpacas: Estudio Preliminar. APPA-ALPA Cusco, Perú.
- Huanca W.,M. Vásquez, M. Cueva, A. Cordero y M. Lino. 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):190-198
- IETS, International Embryo Transfer Society. 1998. Manual of the International et Society. 3rd ed. savoy il. iets: usa. 170 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., Y. Hamaguchi, S. Zhu, T. Miyake and T. Machida. 1992. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene-glycol-based solution by a simple method. Biol Reprod 46(6):1042-1046
- Kasai M. 1996. Simple and efficient methods for vittrification of mammalian embryos. Anim ReprodSc 42:67-75

- Kuleshova LL., D. Macfarlane, A. Trouson and J. Shaw. 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
- Lascombes FA, and R. Pashen, 2000: Results from embryo freezing and post ovulation breeding in a commercial embryo transfer programme. Proceedings 5th International symposium on Equine Embryo Transfer, Havemeyer Foundation Monograph series 3, Saari, Finland, pp 95-96.
- Lehn-Lensen H. and T. Greve. 1982. The survival of cow blastocysts frozen in 1,4m glicerol after plunging between -15 and -60 and rapid thawing. *Theriogenology* 17: 95
- Lehn-tensen H., W. Rall. 1983. Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing. *Theriogenology* 19:263-277.
- Leibo S. 1989. Equilibrium and non equilibrium cryopreservation of embryos *Theriogenology* 31, 86-95.
- Leibo S., N. Songsasen. 2002. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*; 57:303-26
- Liebermann J., F. Nawroth, V. Isachenko, E. Isachenko, G. Rahimi and M. Tucker. 2002. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod* 67(6):1671-1680.
- Mazur P. 1963. Estudios on rapidly frozen suspensions of yeast cells by differential thermal analysis and conductometry. *Biophys J* 3:323-353
- Mazur P., S. Leibo and E. Chu. 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury—evidence from chinese hamster tissue cells. *Experimental Cell Research* 71, 345–355.
- Mazur P. 1977. Slow-freezing injury in mammalian cells. en: the freezing of mammalian embryos, Elsevier, excerpata medica, Amsterdam, pp. 19-48.

- Maurer, R. 1978. Freezing of mammalian embryos: A review of the techniques. *Theriogenology* 9: 45-68.
- Meryman H. 1971. Cryoprotective agents. *Cryobiology* 8, 173–183.
- Miragaya M., M. Chaves, A. Agüero. 2005. Reproductive biotechnology in south American camelids. *Small Ruminant Research*.
- Miyake T., M. Kasai, T. Zhu, T. Sakurai and T. Machida. 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.
- Mucci N., J. Aller, J. Cabodevilla, G. Kaiser, F. Hozbor and R. Alberio. 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.
- Niemann, H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and research needs. *Theriogenology* 35: 109-124
- Niemann H. 1995. Advances in cryopreservation of bovine oocytes and embryos derived “in vitro” and “in vivo”. In: *Reproduction and Animal Breeding, Advances and Strategy*. Elsevier, Amsterdam. pp. 117-128.
- Novoa C. y A. Florez. (Ed) 1991. *Producción de Rumiantes Menores*, Impresores RERUMEN, Lima-Perú.
- Nowshari M., S. Ali and S. Saleem. 2005. Offspring resulting from transfer of cryopreserved embryos in camel (*camelus dromedarius*). *Theriogenology* 63: 2512-2522.
- Palomino H. 2000. *Biología del trasplante y micro-manipulación de embriones de bovinos y camélidos de los andes*. A.F.P. Editores Importadores S.A. Cap 11 pg. 272-273

- Palomino H., E. Medina, O. Li, E. Sumari, N. Calvo, M. Alvarez, F Chang Say y Pandol,. 1996. Transplante de embriones de Alpaca. 1er Congreso Mundial sobre Camélidos. Cajamarca-Perú. 26
- Palomino H., E. Medina, O. Li, E. Sumari, N. Calvo, A. Aguilar, A. Díaz, L. Quispe y O. Angeles. 1996. Recolección y Transplante de embriones por Laparoscopia en Alpacas. 1er Congreso Mundial sobre Camélidos. Cajamarca-Perú. 27
- Pérez G. 1995. Efecto de la GnRH, sobre el desarrollo folicular, métodos de inducción de ovulación y embriones en alpacas. Tesis para optar el grado de magister en Ganadería Andina.
- Rall W. and C. Polge. 1984. Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol. *J. Reprod. Fert.* 70:285-292.
- Rall W. and M. Fahy. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313: 573- 575.
- Rall W. and T. Mayer. 1989. Zone fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology*. 31: 683-692.
- Roche M., P. Boland, R. Mantovani, R.T. Doby, E.W. Overstrom, J.R. Dobrinsky, W.J. Enright, H. Walsh. 1993. The effects of once or twice daily injections of pFSH on superovulatory response in heifers *Theriogenology*, Volume 40, Issue 2, August, Pages 313-321
- Schneider U. and P. Mazur. 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen – thawed embryos. *Theriogenology* 21: 68-79.
- 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

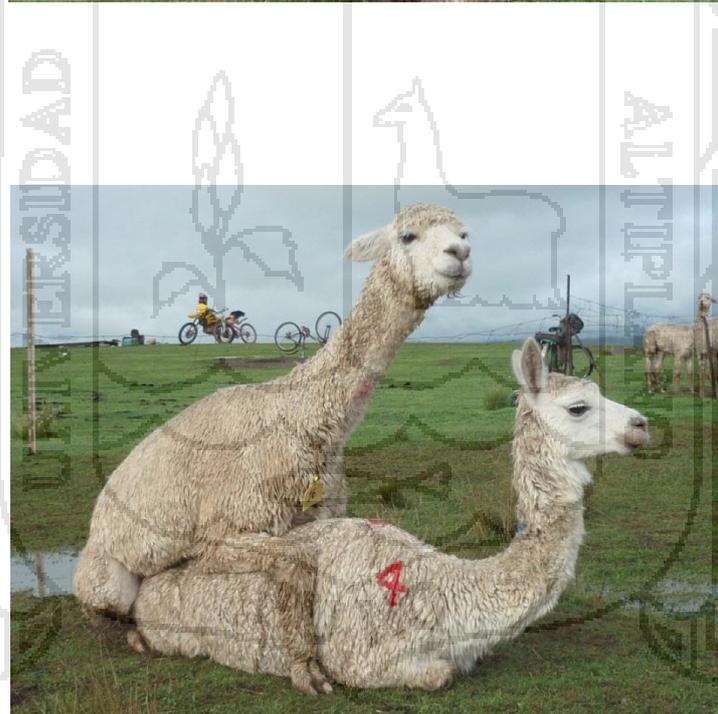
- Shaw J., C. Wart and A. Trounson. 1995. Evaluation of propanediol, ethylene glycol, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow-cooled mouse pronuclear and 4-cell embryos. *HumReprod* 10(2): 396-402
- Shaw J.,LL. Kuleshoval, D. Macfarlane, A. Trounson. 1997. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing pvp, ficoll, or dextran. *Cryobiology* 35(3):219-229
- Skidmore J., N. Loskutoff. 1999. Developmental competence in vitro and in vivo of cryopreserved expanding blastocysts from the dromedary camel (*Camelus Dromedaries*). *Theriogenology* 51, 293 abstract.
- Skidmore J. 2000. Embryo transfer in the dromedary camel (*CamelusDromaderius*) International Veterinary Information Service.
- Skidmore J., M. Billah and N. Loskutoff. 2004. Developmental competence in vitro and in vivo of cryopreserved hatched blastocysts from the dromedary camel (*Camelus Dromedaries*). *Reprod. Fertil. Dev.* 16: 605-609.
- Skidmore J., E. Schoevers and T. Stout. 2009. Effect of different methods of cryopreservation on the cytoskeletal integrity of dromedary camel (*Camelus Dromedaries*) Embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 113: 196-204.
- Sommerfeld V. and H. Niemann. 1999. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylenglicol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*38: 95-105.
- Sumar J. 2000. LLamas y alpacas. Hafez. Capítulo 15. Reproducción e inseminación artificial en animales México: editorial interamericana – Mc Graw Hill.
- Tanaka H., P.Ballarales, J.Masaki and H. Kanagawa. 1997. Teoría y práctica de la fecundación “in vitro”. Capítulo V. Jica. Chile

- Tharasanit T., B. Colenbrander and T. Stout. 2005. Effect of cryopreservation on the cellular integrity of equine embryos. *Reproduction* 129, 789–798.
- Van Blerkom J. 1989. Maturation at high frequency of germinal vesicle-stage mouse oocytes after cryopreservation: alternations in cytoplasmic, nuclear, nucleolar and chromosomal structure and organization associated with vitrification. *Human Reproduction* 4, 883–898.
- Wilmut, I. and L. Rowson. 1973. Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92: 686-690.
- Withenberg T. C. Sevell. 1987. Atlas du developement ambrionnaire precocchez le ovins. inra station de physiologie animal ejouy en josas. Publ. Versaillespp 51.
- Zeron Y., M. Tomczak, J. Crowe and A. Arav. 2002. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. *Cryobiology* 45 143–152.



Anexo 1.

Las fotografías muestran la cópula de las hembras donadoras debidamente enumeradas, con machos.

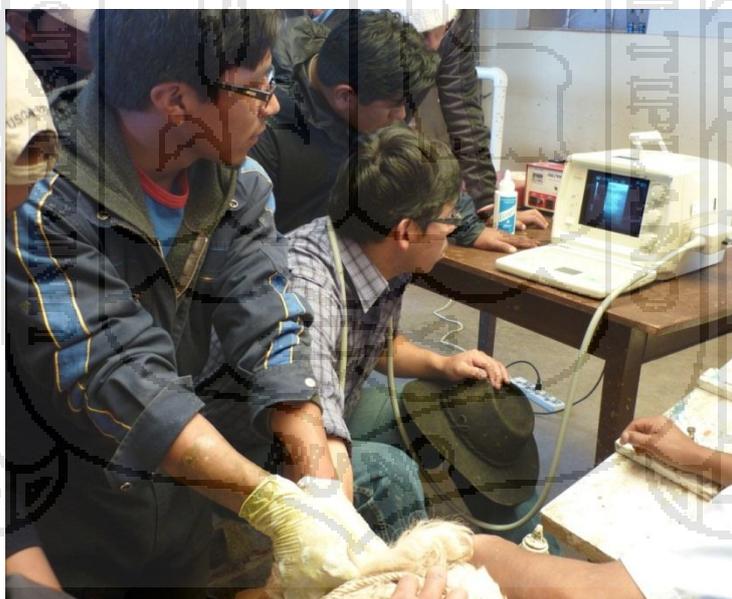


Anexo 2.

Se observa la evacuación de heces e higienización de la zona perineal de donadora

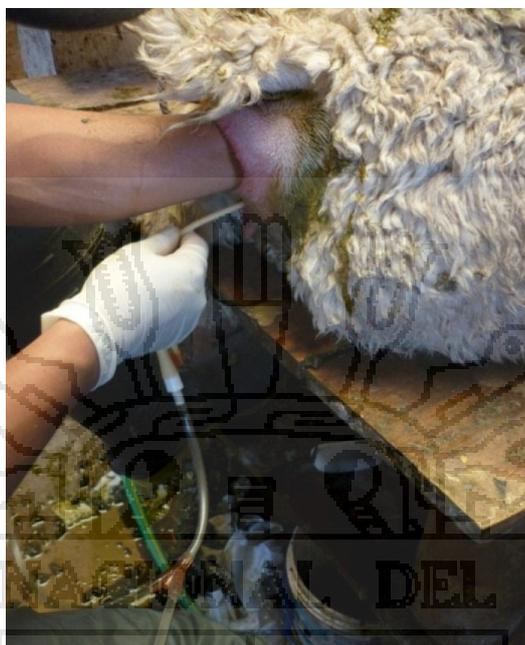


Ecografía de Donadora, ubicando la posición del cuerpo lúteo.



Anexo 3.

Inserción de sonda Foley por manipulación recto-vaginal, para realizar el lavado de embriones.



Filtro colector de embriones recepcionando medio de lavado, proveniente de cuerno uterino.



Filtro colector conteniendo medio de lavado listo para ser vaciado en placa petri.

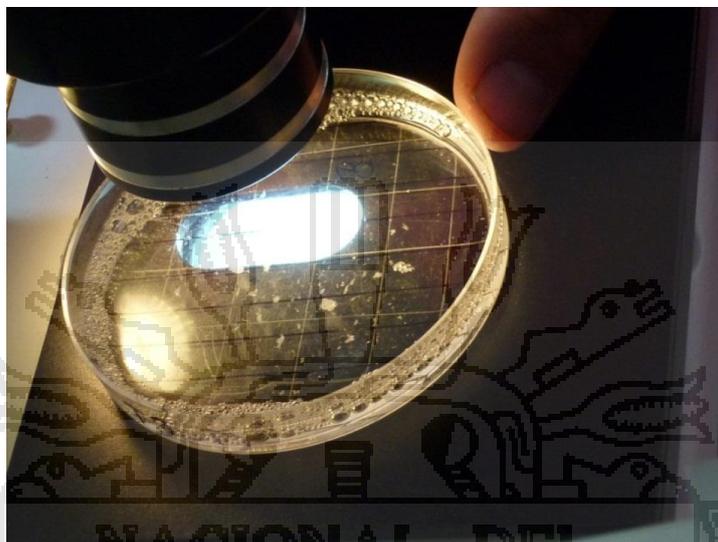


Enjuagado de filtro colector con medio de lavado para evitar adherencia de embrión a paredes y base

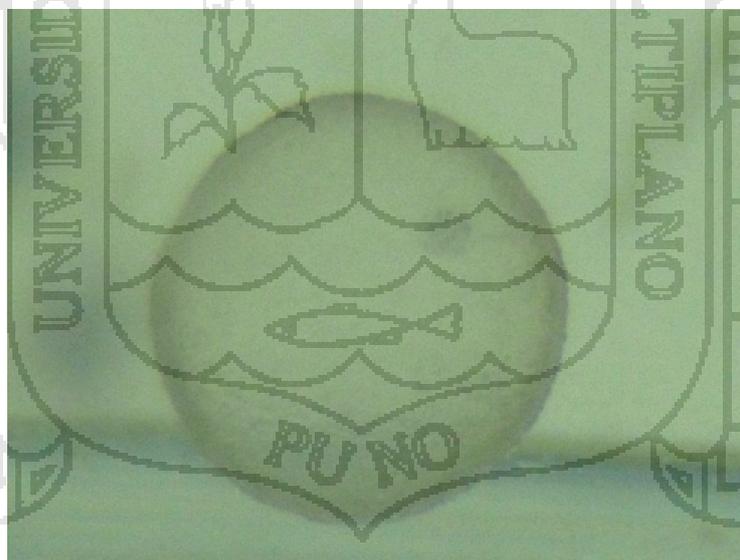


Anexo 4.

Búsqueda de embriones en placa petri de base cuadrículada, bajo el lente del estereoscopio a un aumento de 20X.



Embrión (Blastocisto) de Grado I, zona pelúcida sin irregularidades en su contorno y superficie sin manchas.



Anexo 5.

Pajilla conteniendo embrión en medio de congelación separadas por columnas de aire del medio de mantenimiento.

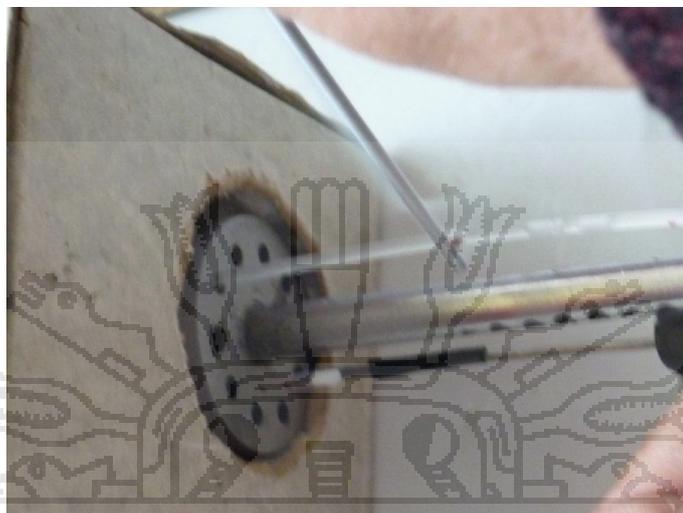
**Anexo 6.**

Calibración del congelador, en el cuello de termo con nitrógeno líquido.



Anexo 7.

“Seeding” con pinza metálica enfriada en nitrógeno líquido.

**Anexo 8.**

Descongelación de embriones en baño María a 37 °C



Anexo 9.

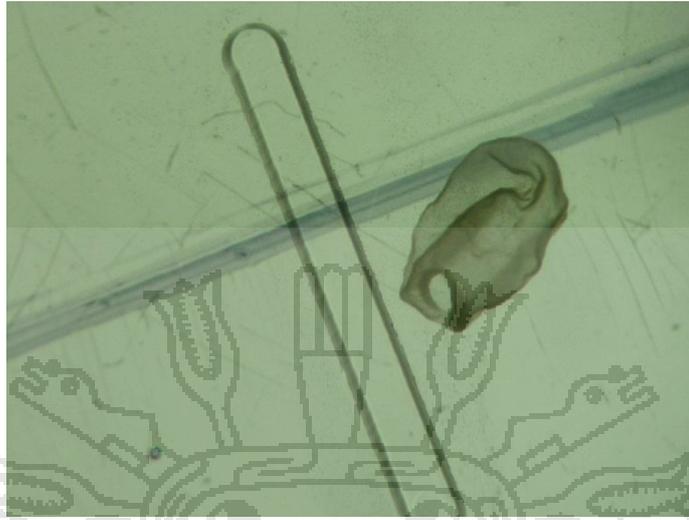
Embriones en proceso de rehidratación, zona pelúcida arrugada sin interrupciones en su contorno



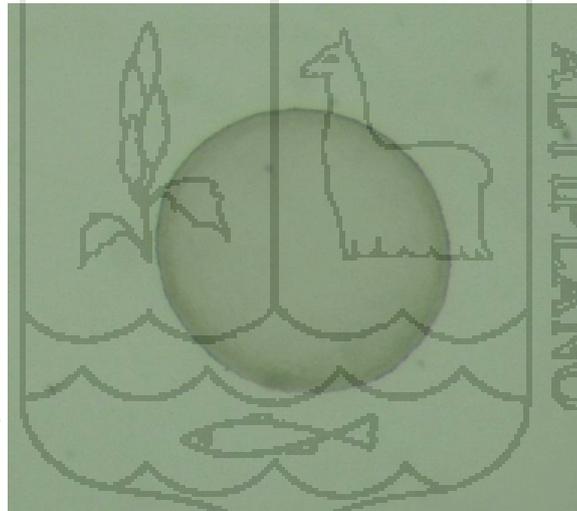
Embrión deshidratado por efecto del crioprotector, zona pelúcida intacta sin daño aparente.



Embrión de Grado IV, zona pelúcida rota, recomiendan no transferir embriones con este tipo de daños.



Embrión descongelado y rehidratado, categorizado en Grado I, completamente esférico, zona pelúcida sin daño, color uniforme de la superficie sin manchas.

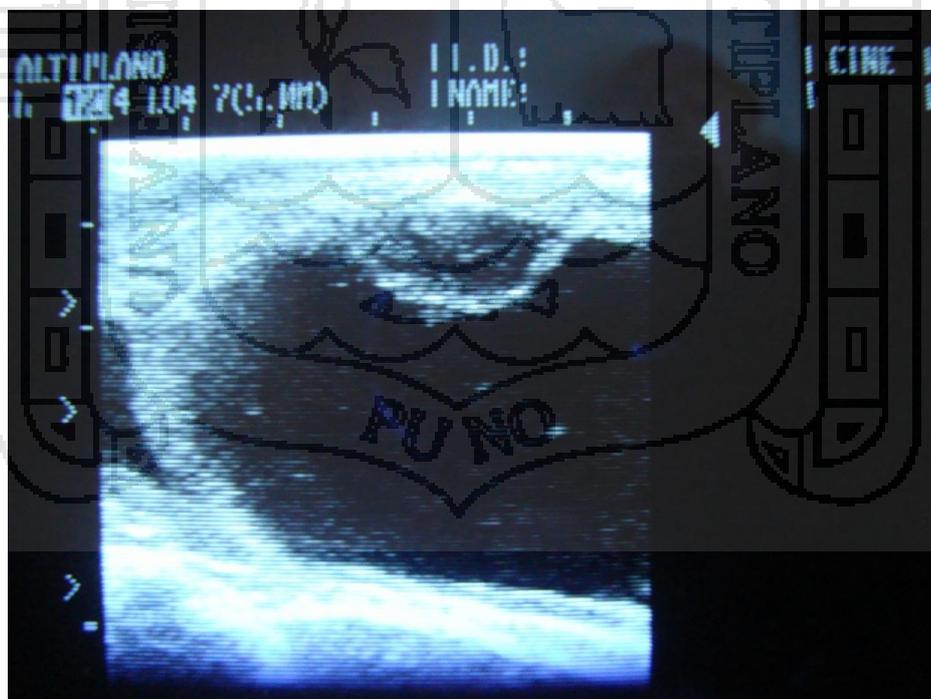


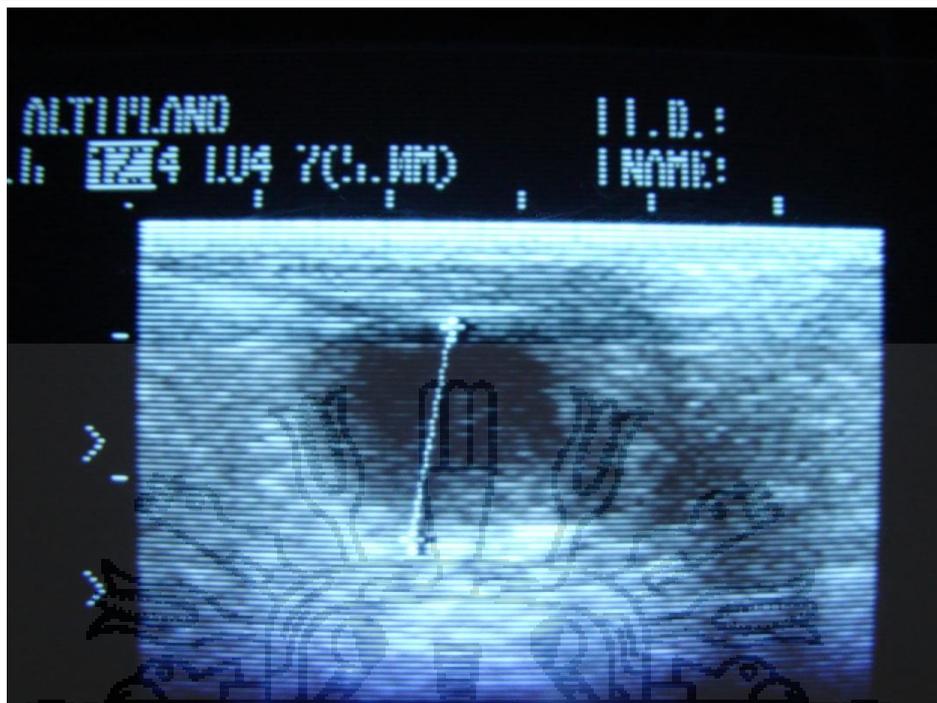
Anexo 10.

Transferencia de embrión descongelado a receptora. (Con pistola de inseminación usada para vacunos).

**Anexo 11.**

Imágenes que muestran ecografía de cuerno uterino de hembra receptora, se visualiza vesícula embrionaria.





Anexo 12.

Categorización de embriones antes y después de congelación/descongelación

	Etilenglicol	Grado	DimetilSulfóxido	Grado
Embriones Frescos	12		12	
Congelados	8	I	9	I
	4	II	3	II
Descongelados	6	I	4	I
	3	II	1	II
	2	III	3	III
	1	IV	4	Se destruyeron

Anexo 13. Registro de Donadoras.

N°	N° ARETE	OVARIO DERECHO	OVARIO IZQUIERDO	EMBRIONES
01	\$ 232.3F		C/L	Mórula
02	8\$ 285 F		C/L	Blastocito congelable
03	A145.7		C/L	Nada
04	6\$ 166 E		C/L	Blastocito congelable
05	4\$H 67 E		C/L	Blastocito congelable
06	S/A (2)		C/L	Nada
07	4\$ 18 D	C/L		Blastocito congelable
08	4\$ H 54 E	Folículos	Folículos	
09	6\$ 157 E	C/L		Blastocito congelable
10	5\$ 157 E		C/L	Blastocito congelable
11	6\$ 050 D		C/L	Blastocito congelable
12	6\$ 071 D	C/L		Blastocito congelable
13	05\$ 4123E	C/L		Blastocito congelable
14	S/A (3)	C/L		Blastocito congelable
15	4\$\$ 64 F		C/L	Nada
16	9\$ 214 E	C/L		Blastocito congelable
17	9\$ 290 F		C/L	Blastocito congelable
18	9\$ 94 E	C/L		Blastocito congelable
19	X 01.9	C/L		Blastocito congelable
20	8\$ 166 E	Folículos	Folículos	Nada
21	9\$ 69 E		C/L	Blastocito congelable
23	6 \$H 67 E		C/L	Blastocito congelable
24	6 \$ 129 E	C/L		Blastocito congelable
25	8 \$ 243 E		C/L	Blastocito congelable
26	16 \$ 91 E	C/L		Blastocito congelable
27	S/A	C/L		Nada
28	4\$H 235 F		C/L	Blastocito congelable
29	7 \$ 0019 E		C/L	Blastocito congelable
30	S/A	C/L		Blastocito congelable
31	01 \$ 103 F		C/L	Blastocito congelable
32	\$ 223.3 E		C/L	Blastocito congelable