

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



VITRIFICACIÓN Y CALIDAD DE EMBRIONES DE ALPACA (*Vicugna pacos*)
RECUPERADOS POR SUPEROVULACIÓN UTILIZANDO LA HORMONA
GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA (eCG)

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

Bach. MVZ. ALDO CASSA SALAS

ABANCAY – PERÚ

2018

I



**“VITRIFICACIÓN Y CALIDAD DE EMBRIONES DE ALPACA (*Vicugna pacos*)
RECUPERADOS POR SUPEROVULACIÓN UTILIZANDO LA HORMONA
GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA (eCG)”**

DEDICATORIA

- A mi madre Estefanía Salas y a mi padre Silverio Cassa, porque nunca perdieron la fe y confianza en mí, me apoyaron en todo momento con su coraje e infinito amor incondicional logrando que termine mi carrera.
- A mi Facultad mi segundo hogar y a la UNAMBA mi gratitud eterna.

III

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la fortaleza interior que me impulsa a alcanzar mis metas, sin importar los obstáculos que se presenten.

A mi asesor de tesis y amigo, Dr. Nilton César Gómez Urviola, por apoyarme incondicionalmente en este trabajo y todas sus enseñanzas.

A mi co-asesor, Dr. Teodosio Huanca Mamani, por sus consejos y exigencias para mejore mi desenvolvimiento profesional.

A los investigadores del INIA-Puno, Dr. Mario Lino Gonzales Castillo, Dr. Oscar Cárdenas Minaya, Dr. Rubén Mamani Cato y a todo el personal del CIP Quimsachata INIA –Puno, por apoyarme incondicionalmente, contribuyendo en la ejecución del trabajo.

A los estudiantes de la UNMSM, UNALM, UCSUR, UJBG, UNA, UNC, quienes compartieron conmigo gratos momentos y me brindaron apoyo cada vez que fue necesario.

A mi gran amigo y hermano, Josec Barrientos Torres, por sus consejos y todas sus exigencias, impulsándome a alcanzar mis metas.

A Rosaluz y Stephen José, por su amor, paciencia, comprensión y apoyo.

A mis hermanos Justo, Mariluz y Javier, por el soporte familiar y sus consejos.

A mis amigos(as) y compañeros(as) de estudio, con quienes compartí momentos gratos.

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

.....
Dr. Leonardo Adolfo Prado Cárdenas
Rector

.....
Dr. Rolando Ramos Obregón
Vicerrector Académico

.....
Dra. Iris Eufemia Paredes Gonzales
Vicerrector de Investigación

.....
MSc. Dora Yucra Vargas
Decano (i) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

V



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC



.....
Dr. Nilton César Gómez Urviola

Asesor



.....
Dr. Teodosio Huanca Mamani

Asesor

JURADOS



MVZ. Martin Equicio Pineda Serruto
Presidente



MVZ. Juan Roberto Soncco Quispe
Primer miembro



MVZ. Gizely Alva Villavicencio
Segundo miembro

ÍNDICE

RESUMEN	XIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Antecedentes	3
2.2 Bases teóricas	10
2.2.1 Historia de la alpaca	10
2.2.2 Importancia de los camélidos sudamericanos	11
2.2.3 Fisiología reproductiva en el macho	12
2.2.4 Fisiología reproductiva en la hembra	14
2.2.5 Hormona gonadotropina coriónica equina (eCG)	17
2.2.6 Comportamiento sexual	19
2.2.7 Estacionalidad reproductiva	21
2.2.8 Influencia de la alimentación en la reproducción	22
2.2.9 Tópicos para la vitrificación y transferencia de embriones	22
2.3 Marco conceptual	34
III MATERIALES Y METODOS	35
3.1 Tipo y nivel de investigación	35
3.2 Materiales y equipos	35
3.3 Población y muestra	37
3.4 Método y diseño de investigación	38

3.5 Recolección de información	46
3.6 Procesamiento y análisis de datos	46
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
V. CONCLUSIONES	53
VI. RECOMENDACIONES	54
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mapa del anexo Quimsachata	37
Figura 2. Cargado de pajilla mediante la técnica de OPS	44
Figura 3. Protocolo de tratamiento hormonal	75
Figura 4. Selección, dosificación y aplicación de medicamentos en alpacas	75
Figura 5. Alimentación de las alpacas	76
Figura 6. Empadre y ecografía de alpacas hembras	76
Figura 7. Soluciones para embriones y aplicación de acepromazina maleato	77
Figura 8. Anestesia epidural, vaciado de heces y ecografía de la alpaca	77
Figura 9. Lavado uterino y recuperación de embriones	78
Figura 10. Filtración y observación del embrión	78
Figura 11. Vitrificación de embriones a -196 °C mediante nitrógeno líquido	79
Figura 12. Baño María a 24.1 °C y observación del embrión descongelado	79
Figura 13. Personal de apoyo en el proyecto	80
Figura 14. Pasos para la vitrificación del embrión en el tanque de nitrógeno	81
Figura 15. Pasos para la desvitrificación de embriones	81

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Superovulación en camélidos sudamericanos	33
Tabla 2. Resultado de la transferencia de embriones en camélidos durante las tres últimas décadas	33
Tabla 3. Composición de las soluciones vitrificantes	42
Tabla 4. Composición química de la dilución.	45
Tabla 5. Tamaño de embriones recuperados clasificados según su calidad	49
Tabla 6. Tamaño de embriones desvitrificados clasificados según su calidad	50
Tabla 7. Asociación entre calidad embrionaria a la vitrificación y desvitrificación.	51
Tabla 8. Asociación entre calidad del embrión y la condición de preñez	52
Tabla 9. Ficha para el acopio de datos.	73
Tabla 10. Ficha de registro de información a nivel de campo.	74
Tabla 11. Pruebas de Chi-cuadrado de Pearson para determinar la asociación de la calidad del embrión recolectado vitrificado y desvitrificado.	82
Tabla 12. Pruebas de Chi-cuadrado de Pearson para determinar la asociación de la calidad del embrión desvitrificado y la condición de preñez.	82
Tabla 13. Tamaño de folículos, según ubicación del ovario en alpacas antes del tratamiento.	82
Tabla 14. Tamaño de cuerpos lúteos, según ubicación del ovario, antes del tratamiento hormonal en alpacas.	83
Tabla 15. Evaluación de la respuesta ovárica al tratamiento con hormona	83

coriónica equina (eCG), según ubicación del ovario en alpacas.

Tabla 16. Tamaño de folículos ováricos, en alpacas al usar la hormona coriónica equina (eCG). 83

Tabla 17. Número de cuerpos lúteos ováricos en alpacas al usar hormona coriónica equina (eCG). 84

Tabla 18. Tamaño de cuerpos lúteos considerándose ambos ovarios en alpacas al usar la hormona coriónica equina (eCG). 84

Tabla 19. Tamaño de folículos considerándose ambos ovarios en llamas para la transferencia. 84

Tabla 20. Tamaño de cuerpos lúteos considerándose ambos ovarios en llamas para la transferencia. 85

RESUMEN

En el Centro de Investigación y Producción Quimsachata del INIA Puno, con el objetivo de vitrificar embriones de alpaca (*Vicugna pacos*) recuperados por superovulación utilizando la hormona gonadotropina coriónica equina (eCG), considerando su calidad, se elaboró un protocolo con base a lo descrito por Saíto *et al.* (1994); Saíto e Imai (1997) y Saíto (2001). Se utilizó tres soluciones, (1) solución de equilibración : (5 ml glicerol + 1.71 g sucrosa + 0.75 g xilosa + 20 ml suero fetal bovino + 2 ml gentamicina) a una temperatura de 28 °C donde se colocó el embrión por 5 min, (2) solución de vitrificación : (5 ml glicerol + 5 ml etilenglicol + 3.42 g sucrosa + 1.50 g xilosa + 20 ml suero fetal bovino + 2 ml de gentamicina), donde los embriones permanecen 5 min, (3) solución para el lavado y conservación : en pajillas de 0.25 ml por embrión (1.5 ml glicerol + 10 ml etilenglicol + 5.13 M de sucrosa + 2.25 g xilosa + 20 ml suero fetal bovino + 1ml de gentamicina), estas después de un minuto son sumergidas en nitrógeno líquido. Se lograron recuperar y vitrificar 26 embriones, los que fueron clasificados como excelentes (30.77%), buenos (46.15%) y regulares (23.08%) con un tamaño promedio de 467.50, 410.00, y 400.00 μm , los mismos luego de la desvitrificación se reclasificaron como excelentes (20%), buenos (44%) y regulares (36%) con un tamaño de 448.00, 438.18, y 342.00 μm , respectivamente. Existe asociación entre la calidad del embrión vitrificado y desvitrificado ($p < 0.01$) y entre la calidad del embrión desvitrificado y la condición de preñez ($p < 0.01$). Únicamente embriones de calidad excelente transferidos fueron viables, lo que posibilitó alcanzar un 60% de preñez en las llamas receptoras.

Palabra clave: biotecnología de la reproducción, camélido, superovulación.

ABSTRACT

At the Research and Production Center “Quimsachata” of INIA Puno, with the objective of vitrifying alpaca embryos (*Vicugna pacos*) recovered by superovulation using the equine chorionic gonadotropin hormone (eCG), considering its quality, a protocol was elaborated based on what was described by Saïto *et al.* (1994); Saito & Imai (1997) and Saito (2001). Three solutions were used: (1) equilibration solution: (5 ml glycerol + 1.71 g sucrose + 0.75 g xylose + 20 ml fetal bovine serum + 2 ml gentamicin) at a temperature of 28 °C where the embryo was placed for 5 min, (2) vitrification solution: (5 ml glycerol + 5 ml ethylene glycol + 3.42 g sucrose + 1.50 g xylose + 20 ml fetal bovine serum + 2 ml gentamicin), where the embryos remain 5 min, (3) solution for the washing and preservation: in straws of 0.25 ml per embryo (1.5 ml glycerol + 10 ml ethylene glycol + 5.13 M sucrose + 2.25 g xylose + 20 ml fetal bovine serum + 1 ml gentamicin), these after one minute are submerged in liquid nitrogen. It was possible to recover and vitrify 26 embryos, which were classified as excellent (30.77%), good (46.15%) and regular (23.08%) with an average size of 467.50, 410.00, and 400.00 µm, the same after devitrification was reclassified as excellent (20%), good (44%) and regular (36%) with a size of 448.00, 438.18, and 342.00 µm, respectively. There is an association between the quality of the vitrified and devitrified embryo ($p < 0.01$) and between the quality of the devitrified embryo and the pregnancy condition ($p < 0.01$). Only embryos of excellent quality transferred were viable, which made it possible to reach 60% of pregnancy in the receiving llamas.

Keyword: biotechnology of reproduction, camelid, superovulation.

I. INTRODUCCIÓN

El Perú cuenta con el 87% (3´685, 516) de la población mundial de alpacas, seguido por Bolivia con el 9.5%. La producción nacional de alpacas abastece al 82% de la demanda de fibra mundial, generando US\$ 800 mil dólares anuales; asimismo el ingreso anual por la comercialización de carne es de 7 800 TM que genera un ingreso de US\$ 8 580 000 por año. Sin embargo, la crianza de alpacas genera el 1.35% del total de las exportaciones del Perú, 5% de las exportaciones no tradicionales y de 2 a 2.5% del PBI manufacturero en los últimos 10 años. Las regiones que tienen mayor población de alpaca son: Puno (1 427 816), Cusco (517 965), Arequipa (477 851), Huancavelica (302 609), Apurímac (224 855) y Ayacucho (193 408) (INEI, 2012).

Cuando se pretende desarrollar un esquema de selección mediante la difusión de los caracteres deseados dentro de un rebaño de alpacas utilizando los procedimientos de cría tradicionales, nos encontramos frente a una labor difícil y lenta, esto sucede por el prolongado periodo de gestación que es de 11 meses, que solo permite obtener una cría por año, es decir que a lo largo de toda la vida reproductiva de una hembra se puede obtener un número máximo de 6 descendientes. Para enfrentar esta restricción la aplicación de la biotecnología de la reproducción está permitiendo multiplicar los animales de calidad a través de la transferencia de embriones en fresco (Correa *et al.*, 1994).

En camélidos, el desarrollo y aplicación de biotecnologías reproductivas ha sido limitado por diferentes factores. Los ensayos sobre vitrificación de embriones a nivel del país es muy escasa 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 vitrificación de embriones, para contribuir en la difusión de material genético de alta calidad a los rebaños que apuestan por el cambio tecnológico, es decir como una herramienta útil 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 producidos al azar, 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 criadores, se planteó como objetivo desarrollar un protocolo para vitrificar embriones de alpacas (*Vicugna pacos*) recuperados por superovulación utilizando la hormona gonadotropina coriónica equina (eCG), considerando su calidad y viabilidad, en el Centro Investigación y Producción Quimsachata del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Estación Experimental Illpa – Puno.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

Paredes *et al.* (2014), en el Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla de la Universidad Nacional del Altiplano Puno, evaluó *in vitro e in vivo* la viabilidad de embriones de alpacas sometidos a la congelación lenta con dos agentes crioprotectores. Utilizaron 24 embriones de grado A, recuperados por el método no-quirúrgico al octavo día post coito de donadoras no superestimuladas. Los embriones fueron distribuidos para la adición de dos crioprotectores de la siguiente manera: 12 embriones con etilenglicol a 1.5 M y 12 embriones con dimetilsulfóxide a 1.0 M en PBS + 10 % de suero fetal bovino. Luego los embriones fueron expuestos por 10 min al crioprotector, donde los embriones se cargaron en pajillas de 0.25 mL y se colocaron en un congelador automático de embriones a -7 °C por un 1 min, seguidamente se realizó el “seeding”, se mantuvieron por 10 min más para su equilibrio y la congelación se realizó con el descenso de la temperatura de 0.5 °C/min hasta -33 °C y finalmente se almacenaron las pajillas en un termo criogénico con nitrógeno líquido hasta su uso. Para la descongelación las pajillas se mantuvieron 8 minutos a temperatura ambiente, luego se sumergieron en baño María a 32 °C/2 min. Se vació el contenido de la pajilla en una placa petri que contenía PBS con 10 % de suero fetal + 0.2 M de sucrosa para su rehidratación por 5 min. Para la evaluación de la viabilidad *in vitro* se hizo con ayuda de un microscopio estereoscopio donde mantenían su morfología el 100 % (12/12) y 66.7% (8/12) de embriones para etilenglicol y dimetilsulfóxide, respectivamente, porcentajes sin diferencia ($p>0.05$). A la evaluación de la viabilidad *in vivo* post transferencia a receptoras se lograron el 58.3 % (7/12) y 37.5 % (3/8) de preñez a la ecografía para el

efecto del etilenglicol y dimetilsulfoxide, respectivamente, sin diferencia ($p>0.05$). Se concluyó que los embriones de alpaca en fase de blastocisto se pueden congelar por el método lento utilizando los crioprotectores etilenglicol o dimetilsulfóxide.

Martínez *et al.* (2014), en la Clínica de Reproducción Animal de la Universidad Nacional de Colombia, evaluaron el éxito de un procedimiento de criopreservación de embriones equinos, a fin de conseguir una preñez viable. Se colectaron embriones equinos al día 6-6.5 ($<300\ \mu\text{m}$; $n=24$) y se sometieron a dos técnicas de criopreservación: grupo 1 ($n=12$), vitrificación, utilizó una solución VS1 (Gli [1.4 M]) 5 min, VS2 (Gli [1.4 M]+ EG [3.6 M]) y VS3 (Gli [3.4 M] + EG [4.6 M]) 1 min. Se empacaron en pajillas de 0.25 ml y se sumergieron en nitrógeno líquido; grupo 2 ($n=12$), congelación lenta: uso una solución de congelación (1.8 M de EG + 0.1 M sucrosa) por 10 min, empacados en pajillas de 0.25 ml, llevados al congelador de embriones, exponiéndolos a una curva de congelación y sumergidos en nitrógeno líquido. Posterior a la descongelación, a los 24 embriones se les removió el crioprotector y luego fueron sumergidos en un medio de cultivo DMEM/F12 + 10 % de suero fetal bovino (SFB) e incubados bajo atmósfera controlada (5 % CO₂, 5 % N₂, 90 % O₂) por 48 h. Se evaluó el desarrollo embrionario en el 75 % de los embriones vitrificados ($n=4$); el 20 % de los embriones fueron sometidos a congelación lenta ($n=1$). No se observaron diferencias significativas en los grupos respecto al desarrollo embrionario, pero sí en la tendencia de supervivencia en los embriones vitrificados. Uno de los embriones vitrificados fue transferido a una receptora, logrando una preñez viable y el nacimiento de un potro vivo.

Fernandez *et al.* (2013), en la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X). Calzada del Hueso 1100, Colonia Villaquietud, Delegación Coyoacán, CP. 04960, México, evaluaron la viabilidad después de la vitrificación de embriones de cerda y oveja producidos *in vitro*. Las células del cúmulo (COCs) fueron obtenidos por punción de folículos de 3 a 6 mm de diámetro a partir de ovarios colectados en rastro. La viabilidad fue evaluada en tres grupos de embriones: sin vitrificar (grupo control), después de la vitrificación (calentamiento) y a 72 horas de cultivo después del calentamiento. La vitrificación se realizó en dos pasos; se inició con etilenglicol (EG) 4 % (v/v) y suero fetal bovino (SFB) 20 % en TCM-199 a 37 °C por 15 minutos, posteriormente fueron transferidos a solución de vitrificación EG 35 %, trehalosa 0.4 M y SFB 20 % en TCM-199, finalmente fueron colocados en pajillas abiertas biseladas (BES). Las pajillas fueron sumergidas y conservadas en nitrógeno líquido por semana. El grupo control presentó una viabilidad total de 74.3 % y los embriones de 8-16 blastómeros y mórulas tuvieron el 100% de viabilidad. La viabilidad total en los embriones calentados fue de 49.3 % y la mayor viabilidad la presentaron los embriones de 8-16 blastómeros 63.7 % y las mórulas 61.7% aunque la diferencia no fue significativa ($p>0.05$).

Vásquez *et al.* (2011), en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos- Lima, determinaron el efecto de dos métodos de criopreservación sobre la supervivencia *in vivo* e *in vitro* de embriones de llama. Se recuperaron 73 embriones en estadio de blastocisto eclosionado mediante una técnica no quirúrgica a los 6.5 días post servicio en llamas superestimuladas. Las llamas receptoras se distribuyeron aleatoriamente en grupo control ($n = 14$), de vitrificación ($n=30$) y de congelación lenta ($n=29$). Para la vitrificación, los embriones fueron expuestos a la

solución de vitrificación (SV) conteniendo 20 % glicerol + 20 % etilenglicol + 0.5 M sucrosa + 10 % suero fetal bovino (SFB) + 50 µg/ml sulfato de gentamicina, y sumergidos en nitrógeno líquido dentro de pajillas de 0.25 ml. Para la congelación lenta, los embriones fueron expuestos a fosfato buffer salino (PBS) con 1.5 M de etilenglicol + 10 % de SFB + 50 µg/ml de sulfato de gentamicina, aspirados en pajillas de 0.25 ml, y enfriados a una tasa de descenso de 0.12 °C/min hasta 5 °C y, luego, en la boca del tanque de nitrógeno, se continuó el descenso a una tasa de 5 °C /min hasta -20 °C por 5 min, y luego se sumergieron en el nitrógeno líquido. En la descongelación se utilizaron soluciones de dilución conteniendo dos concentraciones de sucrosa: 0.5 M y 0.2 M para congelación lenta y 0.25 M y 0.12 M para vitrificación. Se realizó una evaluación *in vivo* a todos los embriones del grupo control y al 50 % de los embriones de los dos grupos experimentales, mediante transferencia directa a hembras receptoras previamente sincronizadas. El diagnóstico de preñez se llevó a cabo por ecografía transrectal a los 20 y 30 días. La preñez fue de 4/13, 2/12 y 0/11 para las receptoras de los grupos control, vitrificados y congelación lenta, respectivamente, sin diferencia estadística. Para 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 h a 39 °C, y se observó su re-expansión mediante la observación de su morfología. Se obtuvo 75.0 % (9/12) de re-expansión en embriones vitrificados y 57.1 % (4/7) en embriones congelados lentamente (4/7), sin diferencia significativa. Se concluyó que la vitrificación podría ser el método adecuado para la criopreservación de embriones de llama.

Vásquez *et al.* (2007), en el Centro de Investigación Quimsachata, INIA-Puno, utilizaron dos alpacas hembras donadoras que recibieron un tratamiento de

superovulación con eCG y fueron montadas naturalmente. A los siete días se realizó el lavado uterino no quirúrgico, recuperándose 9 embriones en estadio de blastocisto y clasificados según lo señalado en el manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (Stringfellow y Sidel, 2000). Los embriones fueron expuestos por 5 minutos a la solución de vitrificación 1 (SV1) (0.1 M de sucrosa, 0.125 M de glucosa y 10 % de glicerol); 5 minutos en la solución de vitrificación 2 (SV2) (0.2 M de sucrosa, 0.25 M de glucosa, 10 % de glicerol y 10 % de etilenglicol) y finalmente transferidos a la solución de vitrificación 3 (SV3), (0.3 M de sucrosa, 0.375 M de glucosa, 20 % de glicerol y 20 % de etilenglicol), por 1 minuto, antes de ser cargados en pajillas de 0.25 ml y ser sumergidos en nitrógeno líquido. Cuarenta y ocho horas después, los embriones fueron descongelados y evaluados. Ocho embriones descongelados de buena calidad morfológica, fueron transferidos a 8 alpacas receptoras previamente sincronizadas; sin embargo, a la evaluación ecográfica ninguna hembra fue diagnosticada preñada. De acuerdo a los resultados, se señaló que posiblemente existan factores que no afectan la calidad morfológica pero si la viabilidad de los embriones transferidos.

Saito *et al.* (1994), en el Ministerio de Agricultura, Silvicultura y Pesca 1, Odakurahara, Nishigo-mura Nishishirakawa-gun, Fukushima, Japón 960, evaluaron el efecto de la adición de azúcares a una solución de vitrificación sobre la tasa de supervivencia de los blastocistos bovinos producidos *in vitro*. Los blastocistos bovinos *in vitro* (IVM) e *in vitro* (FIV) bovino- 6to día- 8 blastocistos bovinos se clasificaron en 3 etapas de desarrollo: blastocitos tempranos, blastocitos y blastocitos expandidos. Los blastocitos se criopreservaron en 3 soluciones de vitrificación: 1) 25 % de glicerol + 25 % de etilenglicol (GE); 2) 20 % de etilenglicol + sacarosa 3/8 M + dextrosa 3/8 M (GESD).

La solución básica fue Dubelcco's PBS suplementado con 20 % de suero fetal de ternera. Los embriones se expusieron a cada solución de vitrificación en 3 etapas, y después de cargarlos en pajillas de 0.25 ml, se sumergieron en nitrógeno líquido. Después del calentamiento en baño María a 20 °C, los crioprotectores se diluyeron en 1/2 M y 1/4 M de sacarosa cada uno durante 5 min. El procedimiento de equilibrio y sustitución, excepto el calentamiento, se realizó a temperatura ambiente (23 a 27 °C). Después de la dilución, los embriones se cultivaron en medio F10 de jamón + 0.1 m MB - mercaptoetanol + 20 % de suero fetal de ternera. Los resultados de las tasas de supervivencia de los embriones a las 48 h de incubación de cada una de las 3 etapas de desarrollo (blastocitos tempranos, blastocitos y blastocistos expandidos) expuestos a los 3 tipos de soluciones de vitrificación (GE, GES y GESD) fueron 23.5, 33.3, 65.8 %; 55.6, 71.9, 90.5 %; y 84.6, 83.3, 95.8%, respectivamente. Estos resultados indican que una mezcla de 25 % de glicerol + 25 % de etilenglicol no es adecuada para la vitrificación de blastocistos bovinos tempranos, sin embargo, la adición de azúcares a la solución es significativa ($p < 0.01$) donde mejoró la tasa de supervivencia de los blastocistos vitrificados, independientemente de su etapa de desarrollo.

Saïto e Imai (1997), en el Ministerio de Agricultura, Silvicultura y Pesca 1, Odakurahara, Nishigo-mura, Nishishirakawa-gun, Fukushima, Japón 961, determinaron el efecto de la adición de diversos monosacáridos a una solución de vitrificación sobre la tasa de supervivencia de los blastocistos bovinos producidos *in vitro*. Los blastocistos bovinos *in vitro* son madurados y clasificados a los 7-8 en estadios de desarrollo: blastocitos tempranos (BT), blastocistos (BL) y blastocistos expandidos (BE). Los blastocistos se crioconservaron en una de las soluciones de vitrificación que consisten en 20 % de glicerol + 20 % de etilenglicol + 0.3 M de sacarosa + 3 % de polietilenglicol

+ 0.3 M (monosacárido). Los monosacáridos, fructosa, glucosa, inositol, manitol, sorbitol y xilosa, se emplearon respectivamente en la solución de vitrificación anterior. La solución básica fue PBS de Dubelcc'o. Los embriones se expusieron a cada solución de vitrificación en sus etapas, y después de cargarlos a pajillas de 0.25 ml, se sumergieron en nitrógeno líquido. Después del calentamiento en un baño de agua a 20 °C, los crioprotectores se diluyeron en 1/2 y 1/4 M de solución de sacarosa cada uno durante 5 minutos. Los procedimientos de equilibrado y dilución, excepto el calentamiento, se llevaron a cabo a temperatura ambiente (23 a 27 °C). Después de la dilución, los embriones se cultivaron en Ham's F10 + B-mercaptoetanol 0.1 mM + 20 % de suero de ternera mortal. Las tasas de supervivencia a las 48 horas (tasa de eclosión a las 96 horas) fueron, 65.5 (55.5), 69.6 (56.3), 71.3 (59.1), 66.1 (56.7), 66.7 (56.7), 85.2 (79.3) % con sorbitol, manitol, fructosa, glucosa, inositol y xilosa, respectivamente. Se concluyó que la adición de xilosa a la solución de vitrificación mejora la supervivencia de embriones bovinos vitrificados producidos *in vitro*.

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 Historia de la alpaca

Los camélidos están actualmente representados en Asia y África, así como en Sudamérica (Nowack, 1991). Cuatro especies de camélidos habitan hoy en Sudamérica, dos de ellas silvestres: el guanaco (*Lama guanicoe*; Müller, 1776) y la vicuña (*Vicugna vicugna*; Molina, 1782), mientras que las formas domésticas corresponden a la llama (*Lama glama*) y la alpaca (*Vicugna pacos*) (Marín *et al.*, 2007).

La alpaca ha sido descrita como descendiente de la vicuña y la llama del guanaco, según las evidencias basadas en la morfología dentaria (Wheeler, 1984). Los análisis genéticos, como el ADN mitocondrial, confirmaron la similitud genética entre la llama y el guanaco y entre la vicuña y la alpaca, revelando hibridación bidireccional. Por análisis de microsatélite ADN se sugiere que la alpaca desciende de la vicuña y que debiera ser reclasificada como *Vicugna pacos* (Kadwell *et al.*, 2001).

Taxonomía de la alpaca

Según Wheeler *et al.* (2006) la taxonomía de la alpaca es la siguiente: reino: Animalia; filo: Chordata; clase: Mammalia; orden: Artiodactyla; familia: *Camelidae*; género: *Vicugna*; especie: *Vicugna pacos*.

Variedades

Según Renieri *et al.*, (2009), existen dos variedades de alpacas, Huacaya y Suri. La variedad Huacaya es más abundante y rústica que la Suri y tiene mayor resistencia al medio, están bien adaptadas al clima frío. Las crías son robustas y nacen con abundante fibra. El vellón es de apariencia esponjosa y las fibras se alzan casi perpendicularmente al cuerpo. Las alpacas Suri se encuentran casi exclusivamente en Perú, en general la mortalidad es más elevada que en las Huacaya. Según Barreda (1991), la alpaca Huacaya tiene un promedio de vida de 11 años, aunque no es poco frecuente ver animales de 16-18 años en plena producción y fecundidad. La fibra constituye la principal fuente de ingresos provenientes de la crianza de alpacas (De Carolis, 1987)

De los cuatro camélidos sudamericanos domésticos, la alpaca es la que destaca en términos económicos por el importante valor comercial que representa su fibra, carne y piel. En Perú, la población total de alpacas Huacaya representa el 85% (blanco 95% y color 5%), y la Suri sólo un 15% (Brenes *et al.*, 2001). Por otro lado, la carne de alpaca tiene demanda local (Pumayalla y Leyva, 1988), aunque la fibra es el producto más importante.

2.2.2 Importancia de los camélidos sudamericanos

La población de alpacas en el Perú en el año 2005 fue de 3 156 101, distribuidos en las diferentes regiones del Perú, que comparado a la población del 2012, 3 685 516 (INEI, 2012), claramente se puede notar que existe un incremento.

El Perú es el principal productor de fibra de alpaca, seguido a gran distancia por Bolivia. La producción de Australia, Estados Unidos y otros países del mundo,

producen cantidades menores. El Perú cuenta con alpacas, llamas, vicuñas y guanacos cuyas poblaciones están distribuidas por la región alto andina en altitudes superiores a los 4 000 m (Sumar, 2007). La alpaca hembra produce un máximo de 4-5 crías a lo largo de toda su vida reproductiva (Novoa *et al.*, 1999). Es por esta razón que las biotecnologías reproductivas están comenzando a aplicarse en las diferentes especies de camélidos.

2.2.3 Fisiología reproductiva en el macho

a) Anatomía del aparato reproductor del macho

Desde el exterior hacia el interior del macho, encontramos las siguientes estructuras:

Testículos: la alpaca macho tiene dos testículos que están localizados en la región perineal por debajo del ano y a nivel del arco isquiático. Tienen de 5-7 cm de longitud, 2.5-3.5 cm de ancho y 3-4 cm de profundidad. El peso del testículo es de aproximadamente 18 g en la alpaca y la orientación del eje mayor es dorso caudal a antero ventral (similar al cerdo). La estructura histológica no presenta gran diferencia con otras especies (Aller, 1998).

Pene: es el órgano copulador del macho. Tiene en su punta una estructura cartilaginosa y está dirigida hacia atrás (Aller, 1998).

Epidídimo: está dividido en tres zonas: cabeza, relativamente voluminosa, se inserta en parte posterior del testículo; cuerpo, porción intermedia delgado y aplanado; cola, porción final, que conecta con el conducto deferente (Casas, 1962; Mayta *et al.*, 2016).

Glándulas sexuales accesorias: la próstata, que tiene forma de “h” ubicada dorsal y lateralmente sobre cuello de la vejiga formado por un cuerpo y dos lóbulos unidos entre si y situados en el primer segmento de la uretra, tiene 4 cm de diámetro y 1 cm de grosor (Aller, 1998). Glándulas bulbouretrales, cubiertas por una cápsula muscular, ubicadas lateralmente a la uretra en la salida pélvica (Mendoza *et al.*, 2012).

b) Pubertad de la alpaca macho

Se define pubertad como la edad en la cual el macho es capaz de liberar gametos y mostrar un comportamiento sexual (Hafez, 2002). La edad de la pubertad es variable y es influenciado por factores genéticos, nutrición, cambios climáticos y la estación reproductiva. Las llamas y alpacas machos pueden mostrar comportamiento sexual a una edad temprana (< 1 año), no obstante una completa erección y penetración solo son posibles cuando el pene está completamente liberado de sus adherencias prepuciales (Escobar, 1984; Sumar, 1985; Fowler *et al.*, 1998). Al momento del nacimiento la alpaca posee un pene completamente adherido al prepucio por un tejido embrionario; al año de edad solo un 8–10% de alpacas se ha liberado de la adherencia pene-prepucial, mientras que a los 2 años el 70% ya está libre de adherencias pene prepuciales y a los 3 años, entre el 95–100% de machos tienen un pene totalmente libre del prepucio (Losno y Coyutupa, 1981; Novoa *et al.*, 1999; Chuna *et al.*, 1999; Bustinza, 2001). El proceso del desprendimiento del prepucio normalmente empieza a los 12 o 13 meses de edad y coincide con el aumento de la concentración de testosterona plasmática (Bravo y Jonhson, 1994). Cuando los machos llegan a la madurez sexual, los testículos crecen y los niveles de testosterona se incrementan más de 1000 pg/ml a una edad aproximada de 20 meses en la mayoría de alpacas (Bravo *et al.*, 1995; Bravo, 2002). El peso promedio

de una alpaca macho al momento de la liberación pene-prepucial es de 70.1 kg y a una edad de 21.5 meses de edad (Sumar, 1988).

2.2.4 Fisiología reproductiva en la hembra

a) Anatomía del aparato reproductor de la hembra

El tamaño y la forma de los ovarios varían con la edad y con su contenido en folículos y cuerpos lúteos. Así, su longitud oscila entre los 5 y 12 mm y su peso entre los 1.9 y 2.4 g (Sumar, 1985; Sato y Montoya, 1990). En las hembras multíparas los ovarios son ovalados o circulares y aplanados lateralmente, y presentan una superficie irregular debida a la presencia de numerosos folículos cuyo diámetro está comprendido entre los 3 y 5 mm (Elwishy, 1992). La presencia de folículos maduros y, sobre todo, de cuerpos lúteos le confiere al ovario un aspecto lobulado. Cada ovario está rodeado completamente por un largo pliegue del mesosalpinx con forma cónica denominado *bursaovarii*, cuya porción apical forma un amplio orificio circular que comunica con la fimbria del oviducto (Bravo *et al.*, 2000). Los oviductos son dos conductos delgados y tortuosos, de 15 a 20 cm de longitud, que comunican la superficie del ovario con el útero. Cada oviducto se une a un cuerno uterino a través de un estrecho orificio que forma una papila protuberante. Esta estructura, denominada istmo, actúa como un esfínter para evitar movimientos retrógrados de los fluidos contenidos en el útero (Sumar, 1985). El útero de la alpaca es bicorne, con forma de Y, presentando dos cuernos uterinos con una longitud media de 7.5 cm y un cuerpo muy corto, en las hembras no gestantes el órgano se localiza en el interior de la pelvis (Sato *et al.*, 1990). El aparato genital está suspendido de las paredes abdominales y pélvicas por amplios ligamentos (Fowler, 1989). El cuerno uterino izquierdo es más grande que el derecho

desde la etapa fetal y prepuberal (Tibary *et al.*, 1997) y esta diferencia se acentúa en las hembras multíparas como consecuencia de que el 98% de las gestaciones tienen lugar en el cuerno izquierdo (Fernández *et al.*, 1973). La mucosa uterina está formada por un epitelio cilíndrico y la submucosa por un tejido fibroso denso que contiene pequeñas glándulas uterinas (Fowler, 1989). El tono y el edema del útero se incrementan durante la fase folicular, manteniéndose relajado y homogéneo durante la fase luteínica (Tibary, 2001). El cérvix es similar al de la vaca, contiene 2 o 3 pliegues anulares (Sato *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1994) y su longitud oscila entre los 2 y 5 cm. El grado de apertura o cierre está sometido a regulación endocrina, de manera que su luz se dilata durante el celo para facilitar la cópula, mientras que se estrecha durante la gestación para evitar la contaminación del útero mientras se completa el desarrollo embrionario o fetal (Sato *et al.*, 1990). La longitud de la vagina varía entre 13 y 15 cm y su diámetro está comprendido entre 3.5 y 5 cm y se caracteriza por tener una mucosa que forma numerosos pliegues (Sumar, 1985; Fowler, 1989). Es una estructura extensible, por lo que a medida que avanza la gestación, el peso del útero ocasiona la desaparición de los mencionados pliegues. El himen, o sus restos, marcan la separación entre la vagina y la vulva. La longitud de la vulva es de unos 3 cm y el clítoris es muy pequeño (Bravo *et al.*, 2000).

b) Pubertad de la alpaca hembra

La mayor parte de alpacas hembras muestran receptividad sexual entre los 12 y 14 meses, a pesar de haberse comprobado que la actividad ovárica (presencia de folículos con un diámetro superior a los 5 mm) se inicia a edades más tempranas (Novoa *et al.*, 1972; Sumar, 1985). Así, la pubertad se produce cuando el animal alcanza el 60% del

peso corporal de un adulto, lo que supone unos 33-36 kg (Sumar, 1985; Smith, 1985). Es muy habitual que no se inicie la primera gestación hasta los 2 años de edad, lo que determina que tenga su primera cría a los 3 años (Fernández *et al.*, 1974). Sin embargo, cuando las condiciones nutricionales son adecuadas es posible lograr que las hembras inicien su primera gestación a los 12 meses de edad, obteniéndose una buena fertilidad (Fernández *et al.*, 1972; Novoa *et al.*, 1972).

c) Dinámica folicular en las alpacas

Las alpacas hembras no expuestas al macho, desarrollan ondas foliculares sucesivas en tres fases de desarrollo, para lo cual un grupo de folículos son reclutados, de ellos es seleccionado uno e inicia su crecimiento, diferenciándose y alcanzando el tamaño ovulatorio (\geq a 7 mm de diámetro); mientras que los demás regresionan (Bravo *et al.*, 1990; Fernández-Baca, 1993; Brown, 2000).

Las tres fases o estadios descritos son: crecimiento, maduración y regresión (Bravo *et al.*, 1990; Novoa, 1991). En el estadio de maduración el folículo dominante inhibe el desarrollo de los folículos más pequeños (Bravo *et al.*, 1990); reportándose una relación inversa entre el diámetro del folículo dominante y el número de folículos pequeños (Adams *et al.*, 1990).

Con respecto a la duración de la onda folicular, determinaron, Bravo *et al.* (1990) un promedio de 13.8 días, siendo el estadio de crecimiento 4.8 ± 1.5 días; maduración 5 ± 1.6 días y regresión 4.0 ± 1.1 días; Adams *et al.* (1990), 20 a 25 días; Aba *et al.* (2000), 22.6 ± 2.5 días; siendo la fase de crecimiento 9.2 ± 2.8 días; maduración 5.2 ± 1.4 días y regresión 8.2 ± 2.2 días; las diferencias encontradas se deberían al estado lactacional de los animales empleados (Adams, 2001).

El intervalo entre ondas foliculares, es decir el período entre la emergencia de folículos dominantes sucesivos, que varía muy probablemente según el diámetro del folículo dominante, se calcula en alpacas 15.8 ± 0.6 días (Vaughan *et al.*, 2004) y en llamas de 18 ± 2.6 días (Chávez *et al.*, 2002).

d) Superestimulación ovárica

La superestimulación ovárica consiste en inducir el crecimiento, maduración y ovulación de un gran número de folículos de manera simultánea. Sin embargo, los camélidos presentan algunas diferencias fisiológicas respecto a otras especies domésticas que se ha de tener en cuenta al aplicar estos tratamientos: 1) estas especies no presentan fases luteales espontáneas; 2) el folículo dominante permanece activo durante períodos prolongados en las hembras no gestantes; 3) la estimulación hormonal del ovario incrementa el número de folículos reclutados al comienzo de cada oleada de crecimiento folicular. Sin embargo, cuando los folículos son reclutados mediante este procedimiento su velocidad de crecimiento es mayor y la maduración de los ovocitos liberados muestra diversos grados de inmadurez nuclear o citoplasmática que puede repercutir negativamente en la fecundación y en el desarrollo embrionario (Sirard *et al.*, 1992).

2.2.5 Hormona gonadotropina coriónica equina (eCG)

Esta hormona es una glucoproteína presente en grandes cantidades en el suero de la yegua entre los días 46 y 130 de gestación y presenta en una misma molécula actividades biológicas propias de la FSH y de la LH (Papkoff, 1978; González *et al.*, 1978). Los preparados comerciales se obtienen a partir de la purificación del suero recogido a yeguas gestantes y su posterior liofilización. Su potencia se expresa en

unidades internacionales, siendo la actividad gonadotrófica específica de 1 UI igual a 0.25 mg de una preparación estándar mantenida por la Organización Mundial de la Salud. La molécula está compuesta por dos subunidades una α y otra β . La primera es la responsable de las actividades FSH y LH, mientras que la subunidad β determina la amplitud de su actividad. El alto contenido en ácido siálico de la molécula de eCG le confiere una larga vida media, que supera ampliamente a las de la FSH y LH. Su vida media se cifra en torno a las 40 horas, aunque puede llegar a persistir hasta 10 días (Schams *et al.*, 1978). Esto permite inducir la respuesta superovulatoria con una única administración, habiéndose demostrado que las administraciones múltiples no mejoran la tasa de ovulación (Hafez *et al.*, 2002).

Las principales ventajas de la utilización de eCG en los tratamientos superovulatorios son su bajo costo y que una única administración permite obtener buena respuesta ovárica. No obstante, esta prolongada vida media provoca también algunos inconvenientes ya que continúa estimulando el crecimiento folicular después de producirse la ovulación lo que provoca la existencia de elevadas concentraciones de estradiol durante la fase luteal, alterando la migración y el desarrollo embrionario y modificando el ambiente uterino (Roche *et al.*, 1984). Por el contrario, cuando se aplica FSH los folículos presentes en el ovario después de la ovulación son muy escasos (Lauria *et al.*, 1982). Existen diversos estudios en los que se ha comparado el efecto de ambas gonadotropinas en la estimulación ovárica de los camélidos domésticos, obteniéndose resultados variables. Correa *et al.* (1997), indican en llamas que no existen diferencias en la tasa de respuesta ovárica a ambas sustancias 17.9 ± 2.2 folículos tras el tratamiento con FSH y 17.7 ± 2.2 folículos en las tratadas con eCG (Ratto *et al.*, 2005).

Cuerpo lúteo

Después de la ovulación comienza la hipertrofia y luteinización de las células de la granulosa. Posteriormente el tejido de este cuerpo lúteo (CL) se agranda principalmente por hipertrofia de las células luteínicas (Hafez, 1996). El CL es claramente detectado alrededor del día 3-4 después de la monta en alpacas, y a los 4-5 días post – monta en llamas, utilizando ultrasonografía (Fernández-Baca *et al.*, 1970; Adams *et al.*, 1991). El CL alcanza un diámetro máximo (12 – 14 mm) al día 8-9 post monta en animales no preñados, pero de aquí en adelante ocurre un declive marcado en el tamaño de éste (Adams *et al.*, 1991). Probablemente exista una relación positiva entre el peso y diámetro del CL y las concentraciones sistémicas de progesterona (Bravo *et al.*, 1997). Los niveles de prostaglandina F₂ α (PGF₂ α) empieza a elevarse (Sumar *et al.*, 1988), principalmente entre los días 9 y 12 (805 \pm 131 pmol / L) (Aba *et al.*, 1995). Esta hormona tiene efecto luteolítico (Leyva y García, 1999b).

2.2.6 Comportamiento sexual

Los camélidos domésticos, alpacas y llamas, al ser especies de ovulación inducida no presentan ciclos estrales definidos, no obstante, existen periodos de receptividad sexual. Estos periodos son bastante prolongados durante la época de apareamiento y en ausencia de machos pueden durar hasta los 36 días presentando breves interrupciones que no sobrepasan las 48 horas (San Martín *et al.*, 1968).

El comportamiento observado durante la etapa de receptividad sexual puede dividirse en cortejo y monta. La fase de cortejo se inicia cuando un macho sexualmente activo entra en contacto con una hembra, tiene una duración variable dependiendo del libido y fortaleza del macho, oscilando entre unos segundos hasta los 10 minutos y cesa cuando

se produce la monta o el macho comprueba que es rechazado (England *et al.*, 1971). Cuando la hembra está receptiva adopta una posición de decúbito esternal en presencia del macho o en las proximidades de una pareja que está copulando, formándose en ocasiones grupos de hembras en posición decúbito esternal (Fernández-Baca *et al.*, 1970; Novoa, 1970).

Los camélidos son los únicos ungulados que se aparean en decúbito esternal. La hembra adopta durante la cópula una actitud pasiva y en ocasiones se dispone en decúbito lateral (Sumar y Adams, 1997). El macho se coloca sobre la hembra y sitúa sus metatarsos lateralmente a los de la hembra (Novoa, 1970). Los machos muestran su excitación con temblores de las orejas, movimientos de la cola, dilatación de los orificios nasales y la emisión de sonidos guturales denominados “orgling” (Novoa, 1970). Algunos autores consideran que estos sonidos intervienen en la descarga preovulatoria de LH (Guilbride y Moro, 1965; Bravo *et al.*, 1994).

Durante la cópula el macho maniobra su pene alrededor de la vulva hasta ubicar la vagina, atraviesa el cérvix, con movimientos suaves hasta llegar a uno de los cuernos uterinos, para ir posteriormente cambiando sucesivamente de un cuerno a otro a lo largo de la eyaculación (Franco *et al.*, 1981). El movimiento del pene en el interior del útero provoca en el endometrio inflamación, edema e hiperemia (Bravo *et al.*, 1996; Velásquez *et al.*, 1999). La duración media de la cópula suele ser de 20 a 30 minutos, aunque el rango es muy amplio variando entre 5 y 65 minutos (England *et al.*, 1971; Sumar, 1985; Fernández-Baca, 1993). La duración de la cópula está influida por diversos factores: número de machos presentes de manera simultánea, edad de las

hembras, jerarquía dentro del rebaño, hora del día, estación del año, etc. (Escobar, 1984; Knight *et al.*, 1992; Pollard *et al.*, 1999).

En alpacas, cinco días post ovulación desaparece la conducta de receptividad del macho, continuando así hasta que el CL regresione en caso de monta infértil (Fernández-Baca, 1971). Pero en los primeros días posteriores a la ovulación en los cuales aún hay presencia de receptividad sexual, se sugiere sean debidos a que los niveles de progesterona secretados por el CL son todavía insuficientes para ejercer el efecto inhibitorio sobre el eje hipotalámico hipofisario (Leyva y García, 1999a). Si no se produce la fertilización, el CL involuciona a partir del día 13 post ovulación, retornando la receptividad al macho (Fernández-Baca, 1971).

2.2.7 Estacionalidad reproductiva

La estación del año tiene muy poca influencia en la ovulación, fertilidad y supervivencia embrionaria (Fernández-Baca *et al.*, 1972), aunque en Nueva Zelanda las alpacas demostraron menor receptividad sexual durante la primavera (Pollard *et al.*, 1995) y en Norteamérica las llamas presentan menor fertilidad durante el verano (Johnston, 1988). Existen opiniones contradictorias en relación a la existencia o no de estacionalidad reproductiva en los camélidos sudamericanos, lo que podría indicar que su patrón reproductivo está influido tanto por las condiciones ambientales, como por las de manejo a que son sometidos. Esta época del año coincide con las condiciones ambientales, que son más favorables, al ser los meses más templados y lluviosos y durante los cuales existe una mayor disponibilidad de pastos (Koford, 1957; San Martín *et al.*, 1968; Sumar, 1985; Franklin, 1993).

La agrupación de machos y hembras ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad sexual de los primeros, pudiendo ocasionar, incluso, la completa desaparición de la libido (Sumar, 1985; 1996). Sin embargo, estos recuperan su actividad sexual de manera inmediata cuando son introducidos a un nuevo rebaño de hembras (Fernández-Baca *et al.*, 1972). No se conocen los mecanismos que regulan la estacionalidad sexual de las hembras o la inhibición del libido del macho como consecuencia del contacto continuo con hembras. Sin embargo, se considera que podrían intervenir algunos factores como la nutrición, la temperatura, la humedad y las horas de luz, así como estímulos visuales u olfativos, por su capacidad para influir en los centros nerviosos que controlan el comportamiento reproductivo (Brown, 2000).

2.2.8 Influencia de la alimentación en la reproducción

Como se refirió previamente, la edad al primer servicio está condicionada por la pubertad y el desarrollo corporal, que depende a su vez de la disponibilidad de recursos forrajeros. En régimen extensivo, las hembras reciben generalmente su primer servicio a los 2 años de edad, y en caso de que el desarrollo corporal sea deficiente, se retrasa hasta los tres años. Sin embargo, cuando los animales se alimentan en praderas cultivadas se acelera la velocidad de crecimiento, es posible realizar el primer servicio a los 12 meses de edad (Larico, 1987).

2.2.9 Tópicos para la vitrificación y transferencia de embriones

Características de embriones recuperados

La recuperación de los embriones puede ser realizada por métodos quirúrgicos o no quirúrgicos. El primer trabajo en el que se describe la recolección de embriones de

alpaca se efectuó a través de una laparotomía y el abordaje quirúrgico del oviducto (Novoa y Sumar, 1968). Posteriormente se comienza a utilizar una técnica no quirúrgica para la recogida de embriones, realizando el lavado del útero a los 7 días de la monta (Wilson *et al.*, 1985).

Los embriones se recuperan y son evaluados normalmente mediante el manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (Stringfellow y Sidel, 2000), que clasifica según su calidad a los embriones en excelentes y buenos, regulares, malos, muertos o degenerados.

Técnicas de criopreservación

El desarrollo de técnicas de criopreservación para la conservación de embriones durante largos periodos de tiempo sin pérdida de su viabilidad, ha permitido la comercialización de embriones a gran escala y ha supuesto una importante reducción de los costos de aplicación de estas tecnologías (Morató *et al.*, 2012).

La crioconservación y almacenamiento de embriones a muy bajas temperaturas (-196 °C) por un largo tiempo, es deseable tanto por razones biológicas como por razones comerciales. Cuando se expone a los embriones a temperaturas extremadamente bajas es posible detener por completo la actividad enzimática, la respiración celular, el metabolismo, el crecimiento, la multiplicación, etc., es decir, no se afecta su viabilidad y genética (Schneider y Mazur, 1984). No obstante, es necesario previamente preparar al embrión con crioprotectores para el descenso y ascenso de la temperatura, ya que en forma contraria moriría (Shaw *et al.*, 2000).

Los protocolos de crioconservación han sido clasificados como lentos o rápidos de acuerdo con la velocidad de enfriamiento y el tipo y concentración de los

crioprotectores usados. Sin embargo, los principios y objetivos de la crioconservación son aplicables a ambos: (1) proteger de los efectos del enfriamiento y congelación, (2) evitar la formación de hielo intracelular y (3) proteger de los efectos tóxicos de los crioprotectores tanto a temperaturas bajas como altas (Critser *et al.*, 1997; Paynter *et al.*, 1999).

La congelación lenta

Es una técnica de crioconservación en la que existe un equilibrio entre la velocidad de enfriamiento, la velocidad de deshidratación y la velocidad de formación de núcleos de hielo. Este tipo de crioconservación se usa para controlar la velocidad de enfriamiento de tal forma que a medida que descienda la temperatura se produzca la penetración del crioprotector al interior de la célula produciéndose un equilibrio osmótico y disminuyendo la probabilidad de formación de cristales de hielo intracelulares. “Para prevenir la formación de hielo intracelular o minimizar el daño que éste pueda causar, todos los protocolos de congelación están destinados a deshidratar las células. En el caso de los protocolos de congelación lenta, este proceso se consigue colocando a las células en una solución que contiene entre un 10 y un 11% (v/v) de crioprotector (aproximadamente 1.5 M). A continuación, la temperatura disminuye y se provoca la formación de hielo (ice seeding) dentro de esta solución. A medida que los cristales de hielo crecen, el agua de la solución pasa de líquido a sólido y la concentración extracelular de solutos incrementa provocando la salida de agua de la célula. Cuanto más baja es la temperatura, más cantidad de agua puede convertirse en hielo, pero la capacidad de la célula para eliminar el agua intracelular también disminuye a medida que la temperatura disminuye. Por lo tanto, el éxito de un protocolo de congelación

lenta se basa en alcanzar el equilibrio entre la velocidad a la que el agua abandona la célula y la velocidad con que este agua se convierte en hielo” (Albarracín, 2005).

La congelación lenta tiene la ventaja de usar concentraciones bajas de crioprotectores, disminuyendo la probabilidad que se produzca toxicidad química y shock osmótico, pero su habilidad para prevenir la formación de cristales de hielo es limitada debido a las bajas concentraciones de crioprotectores que son utilizadas (Arav *et al.*, 2002).

Congelación rápida y ultrarrápida

La técnica de congelación rápida y ultrarrápida previene la formación de hielo intracelular mediante la deshidratación de la célula. De lo que se trata es exponer al embrión a altas concentraciones de solutos permeables (crioprotectores y azúcares) y, posteriormente, a un enfriamiento rápido o ultrarrápido. Los solutos eliminan rápidamente el agua de las células lo que permite sumergirlas directamente en nitrógeno líquido (congelación ultrarrápida) o vapores de nitrógeno (congelación rápida) (Albarracín, 2005). Las tasas de congelación conseguidas con las técnicas de congelación ultrarrápidas (11 000 a 14 000 °C/minuto) disminuyen drásticamente el daño por enfriamiento, permitiendo usar soluciones crioprotectoras menos concentradas (menos tóxicas) y acortar el tiempo de exposición del ovocito al crioprotector (Martino *et al.*, 1996). Los protocolos de congelación rápida se dividen en dos subcategorías (congelación rápida o ultrarrápida y vitrificación) dependiendo de si existe o no formación de hielo en la solución durante la congelación. Sólo en el caso de la vitrificación no se forman cristales de hielo durante la congelación y descongelación, ni intracelular ni extracelular. Por el contrario, si se forman aunque sólo sean trazas de

hielo durante estos procesos, el término correcto debería ser congelación ultrarrápida (Shaw *et al.*, 2000).

Vitrificación

Es una transición de un estado líquido a un estado vítreo sólido sin la formación de cristales, esto debido al rápido descenso de temperatura, la viscosidad de la muestra aumenta hasta un punto en que las moléculas se inmovilizan. De esta forma, se encuentran en un estado sólido aunque su estructura molecular sea la de un líquido extremadamente viscoso (estado vítreo) (Critser *et al.*, 1997). Este aumento extremo de la viscosidad requiere velocidades de enfriamiento muy rápidas (superiores a 2500 °C/min) o elevadas concentraciones de crioprotectores (de 5 a 7 M) (Shaw *et al.*, 2000; Vajta, 2000). La vitrificación presenta numerosas ventajas como la total eliminación de la formación de hielo o la disminución del daño causado por el enfriamiento, puesto que atraviesa el rango de temperatura de +15 a 5 °C a velocidades de enfriamiento muy rápidas (Dobrinsky, 1996; Martino *et al.*, 1996; Isachenko *et al.*, 1998; Zeron *et al.*, 1999). Otra gran ventaja de esta técnica es que no requiere de equipos de congelación caros o sofisticados y puede ser realizada de manera muy sencilla. La consecuencia negativa de esta estrategia radica en el incremento de las probabilidades de lesionar las células debido al choque osmótico y a la toxicidad de los crioprotectores. Sin embargo, se han aplicado diferentes protocolos para intentar disminuir estos efectos negativos, como el uso de crioprotectores menos tóxicos o la combinación de crioprotectores (disminuyendo la toxicidad individual de cada uno, pero manteniendo las propiedades osmóticas y crioprotectoras), la utilización de crioprotectores por etapas (stepwise) y/o la utilización de soluciones concentradas preenfriadas (Vajta, 2000).

Factores a tener en cuentas para reducir daños durante la vitrificación

Para obtener buenos resultados al utilizar el método de vitrificación se debe tener en cuenta los siguientes factores: volumen de la muestra, concentración de crioprotector, método de adición del crioprotector, temperatura y tiempo de equilibrio, tasa de enfriamiento. Todos estos factores están estrechamente relacionados con la permeabilidad y la toxicidad del crioprotector (Celestinos y Gatica, 2002).

En el caso de las altas concentraciones de crioprotectores, se ha comprobado que la exposición de los embriones a los crioprotectores en dos pasos (Kasai, 1996) o a bajas temperaturas (Rall y Fahy, 1985) puede minimizar los efectos tóxicos. También es importante disminuir los tiempos de exposición a los crioprotectores y la adición de sustancias como la sacarosa, trealosa, sucrosa, crioprotectores no permeables que pueden disminuir la toxicidad del medio de vitrificación (Boutron y Peyridieu, 1994).

Crioprotectores y otras sustancias químicas comúnmente utilizadas antes, durante y después de la vitrificación

- **Suero albumina bovina (BSA)**

El BSA es utilizado a menudo como un estándar de concentración de proteínas. El BSA afecta al pH del medio y actúan como quelantes de iones metálicos, contienen factores de crecimiento y ciertas cantidades variables de hormonas que inciden en la diferenciación y proliferación celular (Ball *et al.*, 1985).

- **Fosfato buffer salina (PBS)**

Es una solución tampón que contiene principalmente cloruro y fosfato de sodio, a veces también cloruro y fosfato de potasio. Ayudan a mantener un pH constante. Las concentraciones de iones y osmolaridad de la solución generalmente coinciden con los del cuerpo humano (Heath, 1990).

- **Etilenglicol**

Es un compuesto químico que pertenece al grupo de los dioles. El etilenglicol es un líquido transparente, incoloro, ligeramente espeso como el almíbar y leve sabor dulce. Por estas características organolépticas se suele utilizar distintos colorantes para reconocerlo y así disminuir las intoxicaciones por accidente. A temperatura ambiente es poco volátil, pero puede existir en el aire en forma de vapor. Se fabrica a partir de la hidratación del óxido de etileno (epóxido cancerígeno) (Shaw *et al.*, 1995).

- **Glicerina**

El propanotriol, glicerol o glicerina ($C_3H_8O_3$), es un alcohol con tres grupos hidroxilos ($-OH$). Se trata de uno de los principales productos de la degradación digestiva de los lípidos, paso previo para el ciclo de Krebs y también aparece como un producto intermedio de la fermentación alcohólica. Además junto con los ácidos grasos, es uno de los componentes de lípidos como los triglicéridos y los fosfolípidos. Se presenta en forma de líquido a una temperatura ambiental de $25\text{ }^{\circ}C$ y es higroscópico e inodoro. Posee un coeficiente de viscosidad alto y tiene un sabor dulce como otros polialcoholes (Shaw *et al.*, 2000).

- **Sacarosa (sucrosa)**

La sacarosa, azúcar común o azúcar de mesa es un disacárido formado por alfa-glucopiranososa y beta-fructofuranosa. Su nombre químico es alfa-D-Glucopiranosil - beta-D-Fructofuranósido, es un disacárido formado por alfa-glucopiranososa y beta-fructofuranosa. El cristal de sacarosa es transparente, el color blanco, es causado por la múltiple difracción de la luz en un grupo de cristales (Shaw *et al.*, 1997).

- **Glucosa**

Es un monosacárido con fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$. Es una hexosa, es decir, contiene 6 átomos de carbono, y es una aldosa, esto es, el grupo carbonilo está en el extremo de la molécula. Es una forma de azúcar que se encuentra libre en las frutas y en la miel. Su rendimiento energético es de 3.75 kilocalorías por cada gramo en condiciones estándar. Es un isómero de la fructosa, con diferente posición relativa de los grupos $-OH$ y $=O$. En la industria alimentaria suele denominarsele dextrosa (término procedente de “glucosa” dextrorrotatoria) (Kuleshova *et al.*, 1999).

- **Xilosa**

También llamada azúcar de madera es una aldopentosa, un monosacárido que contiene cinco átomos de carbono y un grupo funcional aldehído. Tiene forma de pirano (hexágono) y se encuentra ampliamente distribuida en distintas materias vegetales: madera (cerezo), paja, etc. También se puede encontrar en los tejidos conectores como en el páncreas o el hígado. Su función es principalmente alimenticia pero también se utiliza para hacer pruebas de la absorción intestinal (Sommerfeld y Nieman, 1999).

- **Polietilenglicol (PEG)**

El PEG conocido como macrogol, es un poliéter ampliamente empleado en la industria. Se produce por la interacción de óxido de etileno con agua, etilenglicol u oligómeros de etilenglicol. La reacción está catalizada por ácidos o bases. Se trata de un polímero soluble en agua de elevado peso molecular capaz de formar puentes de hidrógeno con 100 moléculas de agua por cada molécula de PEG (Liebermann *et al.*, 2002).

- **Gentamicina**

Pertenece a un grupo denominado aminoglucósidos-aminociclitolos con propiedades antibacterianas, particularmente aquellas producidas por bacilos gramnegativos aeróbicos. Sirve para tratar diversas enfermedades graves de piel, pulmón, estómago, vías urinarias y sangre, así como heridas cutáneas y en el ojo. Debido a su gran toxicidad y a los múltiples efectos secundarios, debe evitarse su uso si no es estrictamente necesario (Nuñez *et al.*, 2006).

- **Acetato de buserelina**

La buserelina es un análogo de la hormona natural liberadora de gonadotropinas (gonadorrelina; GnRH; LHRH), con una marcada actividad biológica. El efecto farmacológico inicial de la buserelina es el de una hormona “releasing” sintética para estimular la secreción de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH). La FSH estimula el crecimiento y la maduración del folículo, mientras la LH es responsable de la ovulación y de la formación del cuerpo lúteo (Huanca, 2005).

- **Cloprostenol sódico**

Es una prostaglandina sintética análoga estructuralmente relacionada a la prostaglandina F2 alfa, tiene una isomería óptica D y L, siendo la isomería D, 3 a 4 veces más potente, es uno de los primeros análogos sintéticos de las prostaglandinas que se utilizó en terapéutica y tecnología de producción veterinaria. Su uso en ganado es para inducir la regresión funcional y morfológica del cuerpo lúteo (luteolisis) (Maqueda, 2000).

- **Acepromacina maleato**

Acepromazina o acetilpromazina es un fármaco derivado de los antipsicóticos actualmente se usa casi exclusivamente en la medicina veterinaria para animales como sedante y antiemético. Sin embargo, no alivia la ansiedad y debe administrarse con cuidado en equinos, ya que hay un riesgo alto de parafimosis y priapismo persistente, asimismo, su administración en animales ancianos o debilitados debe ser monitoreada. Aumenta los efectos de los opiáceos, previniendo las arritmias y vómitos (Tobias, 2006).

- **Clorhidrato de lidocaína al 2%**

La lidocaína es un fármaco perteneciente a la familia de los antiarrítmicos, concretamente del tipo amino amidas. Es muy utilizada por los odontólogos. También tiene efecto antiarrítmico, y está indicada por vía intravenosa, la lidocaína se metaboliza en el hígado, a través de hidroxilación del núcleo aromático, y hay otras vías metabólicas aún no identificadas. Se excreta por los riñones. Es un fármaco de elección para anestesia epidural en medicina veterinaria y humana (raqúidea) (Drasner, 1997).

- **Penicilina**

Las penicilinas son antibióticos del grupo de los betalactámicos empleados profusamente en el tratamiento de infecciones provocadas por bacterias sensibles. La mayoría de las penicilinas son derivados del ácido 6-aminopenicilánico, difiriendo entre sí según la sustitución en la cadena lateral de su grupo amino (Bud, 2007).

- **Estreptomicina**

La estreptomicina fue el primer antibiótico descubierto del grupo de los aminoglucósidos; también fue el primer fármaco de la era de la quimioterapia usado en el tratamiento de la tuberculosis. Es un antibiótico bactericida de espectro pequeño, derivado de la actinobacteria *Streptomyces griseus*. La estreptomicina no penetra bien al interior de las células, por lo que es un agente con efecto en contra de los bacilos exclusivamente extracelulares (Wainwright, 1991).

- **Prostaglandina F2 α**

Es una hormona luteolítica que se secreta en respuesta a los pulsos crecientes de estrógenos provenientes del ovario. El mecanismo exacto de la luteolisis no está completamente dilucidado (Weems *et al.*, 2006).

Transferencia de embriones en camélidos

Adams y Ratto (2001), mencionan resultados de estudios en súper estimulación en ovarios y producción de embriones en llamas y alpacas (Tabla 1). Asimismo, presenta resultados de la técnica de transferencia de embriones durante los últimos 30 años en Sudamérica (Tabla 2).

Tabla 1. Superovulación en camélidos sudamericanos.

Especies	N° de animales	Estado fisiológico	Hormona	Embriones viables por donadora	Referencia
Llama	6	Luteal (hCG)	eCG	2.3	Bourke <i>et al.</i> , 1992a
Llama	24	Luteal (GnRh)	eCG	1.4	Bourke <i>et al.</i> , 1992 ^a
Llama	5	Luteal (CIDR)	eCG	2.0	Bourke <i>et al.</i> , 1992ab
Llama	17	Luteal (Norg.)	eCG	1.3	Bourke <i>et al.</i> , 1992ab
Llama	4	Luteal (Norg.)	FSH	0	Bourke <i>et al.</i> , 1992ab
Llama	4 / 4	Luteal (Prog.)	eCG	0	Correa <i>et al.</i> , 1994
Llama	4 / 4	Luteal (Prog.)	FSH	0.5	Correa <i>et al.</i> , 1994
Llama	19	Luteal (GnRH)	eCG	1.6	Bourke <i>et al.</i> , 1995ab
Llama	17	Luteal (Norg.)	eCG	1.3	Bourke <i>et al.</i> , 1995ab
Llama	20	Sexually Receptive	FSH	1.8	Correa <i>et al.</i> , 1997 Ratto <i>et al.</i> , 1997

Huanca (2008).

Tabla 2. Resultados de la transferencia de embriones en camélidos sudamericanos durante las tres últimas décadas.

País	Año	Especie	Número de donadoras	Número de receptoras	Número de preñadas	Número de Nacidos
Perú	1968	Alpacas	3	3	0	0
Perú	1974	Alpacas	15	44	4	1
USA	1985	Llamas	2	2	1	1
Perú	1987	Alpacas	2	3	3	2
UK	1991	Llamas	33	11	3	2
Chile	1994	Llama	1	2	1	1
UK	1995	Llamas/Guanacos	12	10	5	4
USA	2000	Llamas	47		15	
USA	2001	Alpacas/Llamas				2

Huanca (2008).

2.3 Marco conceptual

Embrión

Es la etapa inicial del desarrollo de un ser vivo mientras se encuentra en el huevo o en el útero de la madre. En los organismos que se reproducen de forma sexual, la fusión del espermatozoide y el óvulo en el proceso denominado fecundación determina la formación de un cigoto, que contiene una combinación del ADN de ambos progenitores. Después de la fecundación, el cigoto comienza un proceso de división, que ocasiona un incremento del número de células, que reciben la denominación de blastómeros. Posteriormente se inicia un proceso de diferenciación celular que determinará la formación de los diferentes órganos y tejidos de acuerdo a un patrón establecido para dar lugar a un organismo final. Durante este proceso de diferenciación celular podemos diferenciar tres etapas: basculación, gastrulación y organogénesis. Al concluir el desarrollo embrionario, el organismo resultante recibe el nombre de feto y completará su desarrollo hasta el momento del parto (Andorno, 1993).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Tipo y nivel de investigación

El tipo de investigación es experimental, prospectivo, analítico y longitudinal. El nivel de investigación es relacional. Los datos fueron recabados durante los meses de febrero hasta mayo de 2015.

3.2 Materiales y equipos

3.2.1 Materiales de oficina y de campo

- Papel.
- Bolígrafos.
- Tablero.
- Cuaderno de campo.
- Plumones.
- Sogas.

3.2.2 Materiales de experimentación

a) Hormonas y medios

- Hormona gonadotropina coriónica equina (eCG) (Foligon ®).
- Acetato de buserelina (Conceptal ®).
- Cloprostenol sódico (Lutaprost ®).
- Suero albúmina bovina (BSA).
- Fosfato buffer salina (PBS).

b) Instrumentos para la colecta de embriones

- Catéter Foley doble vía de 18 x 65 cm.
- Filtros EM COM para colecta de embriones.
- Filtros de 0.22 μm para esterilización.
- Tubos Falcón de 5, 10, 15, 20 y 50 ml.
- Frascos Roux de 50, 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Probetas de 250, 500 y 1000 ml.
- Placas petri pequeña mediana y grande.
- Jeringas desechables de 1, 5, 10, 15 y 20 ml.
- Pipetas estériles de 5 y 10 ml.
- Pipetas Pasteur de vidrio.

3.2.3 Materiales de uso farmacológico

a) Tranquilizantes

- Acepromacina maleato (Promazil ®).

b) Anestesia

- Clorhidrato de lidocaína al 2%.

3.2.4 Equipos

- Ecógrafo.
- Estereoscopio.
- Estufa para esterilización.

- Baño María.
- Tanque de nitrógeno.

3.3 Población y muestra

3.3.1 Zona de estudio

El trabajo se realizó en el Centro de Investigación y Producción Quimsachata de la Estación Experimental, ILLPA – INIA, Puno, ubicado en el distrito de Santa Lucía de la provincia de Lampa de la región Puno, a 15°04'00" latitud sur y 70°78'00" longitud oeste, a una altitud promedio de 4200 m y a 118 km de la ciudad de Puno, abarca una extensión territorial total de 6 281 has.



Figura 1. Mapa de ubicación del anexo Quimsachata (INIA)-Puno

3.3.2 Muestra

Para la colección de embriones se seleccionó una muestra por conveniencia de 16 alpacas hembras considerando sus antecedentes de fertilidad (partos anteriores en otras

campañas), pesos promedios de 40 kg, historial reproductivo óptimo, y además se comprobó que el recto tuviera dimensiones que permitieran el paso de la mano con el objeto de manipular fácilmente el útero. Por otra parte, se seleccionó 8 reproductores machos adultos de 4 a 8 años de edad con buena condición corporal, presencia de dos testículos en la bolsa escrotal y pene sin fimosis ni parafimosis. Todos los animales estuvieron clínicamente sanos.

3.4 Método y diseño de investigación

3.4.1 Etapa pre experimental

Los animales machos y hembras fueron alimentados *ad libitum* antes de la experimentación a base de pastos naturales de la zona, más una suplementación con pacas de avena y alfalfa.

3.4.2 Inducción de la superovulación

Se exploró los ovarios de las alpacas hembras con un ecógrafo SIUI, Modelo CTS-385V / SSD-500, marca ALOKA, durante tres días consecutivos, buscando folículos en crecimiento con un diámetro superior a 7 mm en el día 0. Los animales observados recibieron 1 ml de acetato de buserelina (0.0042 mg) con el propósito de inducir la ovulación, luego de 2 días fueron explorados nuevamente para observar la ovulación del folículo dominante. Después se aplicó vía intramuscular profunda una dosis de 650 UI (3.3 ml/animal) de la hormona gonadotropina coriónica equina (eCG) para la superovulación. Al día 6 post aplicación, se les administró 0.075 mg/animal de cloprostenol sódico intramuscularmente para la destrucción de cualquier cuerpo lúteo presente, al día 7 se le practicó monta natural con machos, al día 13 se realizó una

ecografía para observar cuerpos lúteos presentes, al día 14 se realizó el lavado y recuperación de embriones. Todos los datos recogidos durante este proceso fueron anotados en una ficha individual (anexos) para cada una de las hembras donantes.

Transferencia de embriones.

Para la transferencia de embriones se seleccionó 19 llamas hembras receptoras considerándose como requisito el registro de por lo menos un parto. Estos animales fueron preparados de la misma forma que las alpacas.

3.4.3 Recuperación, evaluación y clasificación de embriones

Paso 1. Aplicación del tranquilizante y vaciado del contenido rectal

Se utilizó 4 mg/animal de acepromacina maleato antes de su ingreso a la manga de manejo. Luego se procedió a vaciar el contenido rectal, precisando la posición, dimensiones del útero y la respuesta ovárica al tratamiento superovulatorio (número de cuerpos lúteos y presencia de folículos).

Se aplicó caudalmente 40 mg de lidocaína clorhidrato al 2% (anestesia epidural) con el fin de contar con una buena relajación del recto y finalmente se realizó la limpieza y desinfección de la región perineal.

Paso 2. Colocación del catéter y lavado del útero

Se utilizó un mandril estéril y lubricado con BSA dentro del catéter Foley N°18 de dos vías que fue introducido por el vestíbulo separando los labios vaginales con la ayuda del mandril. Para atravesar la cérvix esta fue fijada por el recto, y luego se empujó suavemente el catéter en el sentido craneal hasta llegar aproximadamente a los cuernos

uterinos (borde del ligamento intercornual), luego se libera el catéter del mandril retirándolo parcialmente. Después de esta maniobra se procedió a inyectar aire al catéter con una jeringa de 10 ml hasta inflar el globo de autorretención.

Paso 3. Lavado de cuernos uterinos

El medio de lavado estuvo compuesto de PBS (10X) con 1% de BSA, penicilina y estreptomicina, previamente calentado a una temperatura de 37 °C, el cual fue filtrado a través de un filtro con un diámetro de 70 µm (EmCon, USA).

Los dos cuernos fueron lavados mediante una jeringa de 50 ml con el objetivo de coleccionar embriones que pudieran estar suspendidos en el tracto uterino, para ser más eficiente se realiza un frotamiento suave del útero a través del recto. Una vez culminado el lavado de ambos cuernos uterinos, se procede a retirar el catéter primero aspirando el aire del globo de autorretención con sumo cuidado. El líquido recolectado por la sonda Foley debe ser filtrado.

Pasó 4. Embriones seleccionados

Los embriones son transportados a una placa Petri de 3 mm o una placa de cuatro pocillos Nunc, que contienen un medio enriquecido con suero fetal bovino. Todos los embriones coleccionados fueron evaluados y clasificados por calidades según el manual de la Sociedad Internacional de Trasferencia de Embriones (Stringfellow y Sidel, 2000) en la forma siguiente: grado 1: excelente; grado 2: buena; grado 3: regular.

Grado 1 (embriones excelentes y buenos). Son embriones esféricos, simétricos con células de tamaño, color y texturas uniformes. Puede haber pequeñas imperfecciones como algunas blastómeras sueltas, tamaño irregular o algunas vesículas.

Grado 2 (embriones regulares). Tienen problemas más definidos incluyendo blastómeras sueltas, vesículas o células degeneradas; estos embriones pueden ser congelados pero se obtendrán resultados bajos.

Grado 3 (embriones malos). Blastómeras sueltas, células degeneradas. Células de distinto tamaño, color y textura, formas irregulares. Numerosas vesículas.

Grado 4 (muertos o degenerados). Son embriones cuyas blastómeras se encuentran en desorden y sueltas, hay muchas vesículas. Pueden tener un aspecto granular como los infertilizados y tener un crecimiento retardado con respecto a los otros embriones de la colecta. No se congelan ni se transfieren en fresco.

Paso 5. Aplicación de prostaglandina (PF2alfa) para la luteólisis

Culminado el lavado de ambos cuernos uterinos, las alpacas recibieron 1 ml de PF2 α por vía i.m. para inducir la luteólisis y reiniciar una nueva onda folicular.

3.4.4 Criopreservación de embriones

Se utilizó 26 embriones para la vitrificación. La calidad de embriones seleccionados correspondió a excelente (grado I), bueno (grado II) y regular (grado III), según la clasificación de la Sociedad Internacional de Trasferencia de Embriones (Stringfellow y Sidel, 2000). Los embriones una vez clasificados fueron vitrificados.

3.4.5 Protocolo de vitrificación

Se utilizó un protocolo elaborado con base a lo descrito por Saíto *et al.* (1994); Saíto e Imai (1997); Saíto (2001). El protocolo considera 3 soluciones: (1) solución de calibración (5 ml glicerol + 1.71 g sucrosa + 0.75 g xilosa + 20 ml suero fetal bovino +

2ml gentamicina) a una temperatura de 28 °C donde se coloca el embrión por 5 min; (2) solución de vitrificación (5 ml glicerol + 5 ml etilenglicol + 3.42 g sucrosa + 1.50 g xilosa 20 ml suero fetal bovino + 2 ml de gentamicina), donde permanecen 5 min; (3) solución de enriquecimiento o mantenimiento (1.5 ml glicerol + 10 ml de etilenglicol + 5.13 g de sucrosa + 2.25 g xilosa + 20 ml suero fetal bovino + 1 ml de gentamicina), donde permanecen por 1 minuto antes de ser colocados a las pajillas de 0.25 ml (1 embrión/pajilla), y ser sumergidos en nitrógeno líquido a -196°C.

Paso 1. Preparación de medios

Se pesó los crioprotectores sucrosa, xilosa, polietilenglicol; y se colocó en un matraz de 50 ml para cada solución.

Tabla 3. Composición de las soluciones vitrificantes

Sucrosa	Xylosa	PEG	GL	EG	D-PBS
(1) 1.7115 g	0.7507 g	0.5 g	5 ml	-	up to 50 ml
(2) 3.4230	1.5013	1.0	5	5 ml	up to 50 ml
(3) 5.1345	2.2520	1.5	1.5	10	up to 50 ml

PEG= polietilenglicol; **GL=**glicerol; **EG=**etilenglicol; **D-PBS=**soluciones salinas tamponadas con sulfato de Dulbecc'o.

Se añadió 10 ml de D-PBS en cada matraz, luego se disolvió los azúcares completamente. Se añadió el glicerol y etilenglicol mezclándolos. Finalmente, la solución es ajustada a 50 ml con D-PBS.

Paso 2. Preparación de componentes crioprotectores

Se pesó la sucrosa y se disolvió en 20 ml de D-PBS. Después de disolver, se esterilizó con un microfiltro. Después de mezclar bien todos los crioprotectores, se procedió a esterilizar las soluciones con un microfiltro de 0.22 μm en un matraz Erlenmeyer de 50 ml para cada solución. Luego se llevó a una refrigeradora para conservar.

Paso 3. Vitrificación de embriones

Estabilización

El embrión previamente depositado en un medio de mantenimiento (suero fetal bovino) se transfirió a las soluciones vitrificantes, depositadas en pocillos de 35 mm. Primero, el embrión es transferido a la solución vitrificante 1 (VS1), luego a la 2 (VS2) y 3 (VS3), en esta última solución el embrión flota en la superficie y esto se aprovecha para absorberlo mediante una pajilla de conservación de 0.25 ml.

Cargado de la pajilla

Antes de la estabilización, la pajilla es puesta en una platina termorreguladora a una temperatura de 37 °C, luego fue preparada con una columna de 3 mm de solución de sucrosa en solución de PBS separada por una pequeña burbuja de aire de otra columna de 5 mm de la solución VS3, separada a su vez por otra pequeña burbuja de aire de una columna de 5 mm de la solución de vitrificación como se puede observar en la Figura 2.

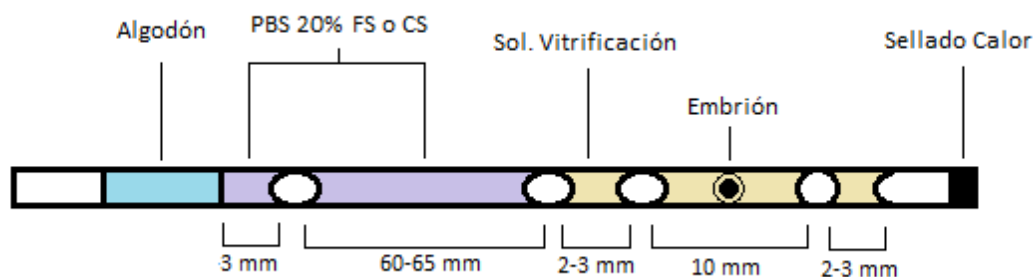


Figura 2. Cargado de embrión en pajilla mediante la técnica Open Pulled Straw (OPS)

Después de la estabilización del embrión, se deja 60 mm de PBS al 20 %, entre dos burbujas de aire, como se puede apreciar en la Figura 2. Ya cargada la pajilla se le pone un tapón de alcohol polivinilico o algodón en ambos lados codificándolo con un plumón de colores.

Conservación de pajillas con embrión en el tanque de nitrógeno líquido (NL)

La pajilla por el extremo del algodón es sumergido lentamente dentro del tanque de nitrógeno líquido hasta congelarse a -196°C .

Paso 4. Descongelación de embriones vitrificados

El embrión vitrificado se mantuvo en el tanque de nitrógeno durante tres meses, luego fue retirado para su evaluación.

Calentamiento

- Después que la pajilla fue retirada del nitrógeno líquido se expuso en el aire por cinco segundos; luego se llevó al baño María a una temperatura de 24.1°C .
- Seguidamente se extrajo la pajilla del agua con suma delicadeza, cuando la solución de sucrosa se hubo descongelado.

- Luego de cortar la pajilla en ambos extremos, la parte sellada se colocó en la superficie del pocillo vacío para verter la solución de sucrosa conteniendo el embrión.
- La búsqueda del embrión se realizó en un estereoscopio, removiendo la solución con sumo cuidado. Una vez encontrado el embrión este fue colocado en otra placa que contenía un medio de mantenimiento (holding) con el fin de realizar el lavado del embrión.
- En esta parte del procedimiento, los embriones localizados en el medio de mantenimiento fueron depositados en una placa pequeña conteniendo una solución de sucrosa 0.5 M durante cinco minutos.
- Ya pasado los cinco minutos los embriones fueron transferidos a otra placa con solución sucrosa 0.25 M + una solución de D-PBS + suero fetal bovino, en el cual se mantienen por otros cinco minutos, después de este tiempo los embriones fueron evaluados y clasificados según la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (Stringfellow y Sidel, 2000).

Tabla 4. Composición química de la dilución

	Sol. stock	D-PBS	SF ml	Composición	
0.5 M Sucrosa	4	0	1	Sucrosa	10.697 g
0.25 M Sucrosa	2	2	1	D-PBS	50 ml
D-PBS + 20% CS	0	4	1		

Solución stock para solución sucrosa al 0.5 M

3.5 Recolección de información

Toda la información recogida en cada una de las etapas del trabajo experimental fue registrada en una ficha individual (anexos) para cada uno de los animales. Los datos recolectados en forma resumida fueron: estructuras presentes en el ovario a la exploración ecográfica, número de embriones totales recuperados, evaluados, clasificados, vitrificados y desvitrificados, vueltos a evaluar y clasificar.

3.6 Procesamiento y análisis de datos

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

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

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

El tamaño de los embriones recuperados y desvitrificados se comparó dentro de sus diferentes calidades mediante el ANOVA de un solo factor. La notación que expresa el diseño empleado es:

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

Donde X_{ij} es la variable respuesta para la j -ésima observación en el i -ésimo tratamiento, μ es la media general de la población, α_i es el i -ésimo efecto del tratamiento, que es la diferencia entre la media del i -ésimo tratamiento y la media general de la población, y ε_{ij} es el error experimental (Navidi, 2006).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Protocolo de vitrificación de embriones para alpacas

Se aplicó un protocolo de vitrificación de embriones de bovinos, para alpacas con base a lo descrito por Saíto *et al.* (1994); Saíto e Imai (1997) y Saíto (2001), considerando tres soluciones vitrificantes:

- a) Solución de calibración (5 ml glicerol + 1.71 g sucrosa + 0.75 g xilosa + 20 ml suero fetal bovino + 2 ml gentamicina) a una temperatura de 28 °C donde se colocó los embriones por 5 min;
- b) Solución de vitrificación (5 ml glicerol + 5 ml etilenglicol + 3.42 g sucrosa + 1.50 g xilosa + 20 ml suero fetal bovino + 2 ml de gentamicina), donde los embriones permanecieron 5 min;
- c) Solución de enriquecimiento o mantenimiento (1.5 ml glicerol + 10 ml etilenglicol + 5.13 g sucrosa + 2.25 g xilosa + 20 ml suero fetal bovino + 1 ml gentamicina), donde los embriones permanecieron por 1 minuto antes de ser colocados a las pajillas de 0.25 ml (1 embrión / pajilla), y ser sumergidos en nitrógeno líquido a -196°C.

Los procedimientos realizados fueron adaptados del protocolo recomendado para vitrificar embriones bovinos (Saito, 2001). Los embriones tienen una elevada sensibilidad a la criopreservación, debido a sus características morfológicas, que los diferencian de otras estructuras, esta sensibilidad está influida por el grado de deshidratación, especie, edad, calidad y estadio del embrión (Abdalla *et al.*, 2012; Morató *et al.*, 2012). El protocolo de vitrificación de embriones para una especie en concreto es difícil de adaptar a otra especie debido al tamaño del ovocito, pero es

posible. De lo que se trata es que no se formen cristales intra y extracelularmente y esto se logra con la vitrificación (Martino *et al.*, 1996; Shaw *et al.*, 2000). Para elaborar el protocolo se tuvo cuidado en considerar crioprotectores que disminuyan el punto eutéctico de las soluciones y de esta forma lograr un embrión más deshidratado y sometido a un gradiente osmótico menor (Avila *et al.*, 2006). Se incorporó soluciones vitrificantes recomendadas para alpacas que incluyeran etilenglicol (EG) y glicerol (Yang *et al.*, 1992; Donnay *et al.*, 1998; López-Béjar y López-Gatius, 2002). Otros componentes químicos añadidos fueron la xilosa que no penetra la célula y es importante para extraer el agua libre intracelular mediante la presión osmótica; asimismo, preserva la estructura de las membranas celulares y su funcionalidad (Saito *et al.*, 1997). Se añadió también sucrosa que en combinación con el EG es menos tóxico dado su bajo peso molecular y velocidad de penetración celular (Dochi *et al.*, 1990; Leeuw *et al.*, 1994; Saha *et al.*, 1996). La sucrosa previene la penetración excesiva de otros crioprotectores al embrión (Ali y Shelton, 1993; Saito *et al.*, 1994), y en combinación con la xilosa son capaces de extraer el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica sin penetrar la célula, encapsulando al embrión en una matriz viscosa previniendo la cristalización intracelular durante la descongelación (Kuleshova *et al.*, 1999), esto ocurre al reducir el choque osmótico (Liebermann *et al.*, 2002). Este aumento extremo de la viscosidad requiere velocidades de enfriamiento muy rápidas (superiores a 2500 °C/min) o elevadas concentraciones de crioprotectores (de 5 a 7 M) (Shaw *et al.*, 2000; Vajta, 2000), atravesando un rango de temperatura de +15 a -5 °C a velocidades de enfriamiento muy rápidas (Zeron *et al.*, 1999). La utilización de los crioprotectores fue por etapas (*stepwise*), para disminuir su toxicidad y mantener sus propiedades osmóticas y crioprotectoras (Vajta, 2000).

La xilosa es un crioprotector no permeable, que deshidrata al embrión, reduce la probabilidad de formación de hielo intracelular, concentra macromoléculas en el citoplasma y facilita la vitrificación intracelular, previniendo la penetración excesiva de otros crioprotectores al embrión (Albarracín, 2005).

4.2 Calidad de embriones de alpaca estimuladas con eCG, recolectados y desvitrificados

4.2.1 Calidad de embriones recolectados

Los embriones recuperados fueron clasificados como excelentes (30.77%), buenos (46.15%) y regulares (23.08%) con un tamaño de 467.50, 410.00 y 400.00 μm , respectivamente. Al comparar los tamaños de los embriones recolectados de las diferentes calidades no existió diferencia significativa ($p > 0.05$), los altos coeficientes de variabilidad se deben al escaso número de embriones evaluados (Tabla 5). Estos embriones después de la evaluación fueron vitrificados.

Tabla 5. Tamaño de embriones recuperados clasificados según su calidad

Calidad de embriones	n (%)	Prom. \pm DS (mm)	CV (%)	Mínimo	Máximo
Excelente	8 (30.77%)	467.50 \pm 164.9	35.27	280	680
Bueno	12 (46.15%)	410.00 \pm 163.0	39.76	240	800
Regular	6 (23.08%)	400.00 \pm 208.2	52.05	220	800

n=número de embriones; DS= desviación estándar; CV= Coeficiente de variabilidad.

Cervantes (2011) recuperó a nivel de cuerno uterino, un 81.4% (35/43) entre embriones buenos y excelentes y un 100% (12/12) del oviducto, cifra superior a lo logrado por nosotros (76.9%). Esta diferencia podría deberse a que Cervantes (2011) recolectó los

embriones, utilizando el método denominado circuito abierto con flujo discontinuo de 14 alpacas faenadas. Esta apreciación se corrobora por lo indicado por Vasquez *et al.* (2007), quienes mediante el lavado uterino recuperaron 9 embriones de alpaca, 7 (77.78%) de calidad buena y 2 (22.22%) de calidad regular. Así mismo, Vásquez (2011), al evaluar 23 embriones recolectados de llamas superovuladas, encontró que el 69.6% fueron de calidad excelente y 30.4% de calidad buena. En todos los casos analizados resulta de suma importancia el protocolo utilizado, Quispe (2015) por ejemplo, solamente pudo recolectar un embrión de 15 alpacas superovuladas con eCG.

4.2.2 Calidad de embriones desvitrificados

Los embriones desvitrificados fueron clasificados como excelentes (20%), buenos (44%) y regulares (36%) con un tamaño de 448.00, 438.18 y 342.00 μm , respectivamente. Al comparar los tamaños de los embriones desvitrificados de las diferentes calidades no existió diferencia significativa ($p>0.05$), los altos coeficientes de variabilidad se deben al escaso número de embriones evaluados (Tabla 6).

Tabla 6. Tamaño de embriones desvitrificados clasificados según su calidad

Calidad de embriones	n (%)	Prom. \pm DS (mm)	CV (%)	Mínimo	Máximo
Excelente	5 (20.00%)	448.00 \pm 209.09	46.67	200	680
Bueno	11 (44.00%)	438.18 \pm 149.79	34.18	200	660
Regular	10 (36.00%)	342.00 \pm 153.03	44.75	220	700

n=número de embriones; DS= desviación estándar; CV= Coeficiente de variabilidad.

Vásquez (2008), desvitrificó 5 (41.67%) embriones de calidad excelente y 7 (58.33%) de calidad buena utilizando una solución de sucrosa 0.25 M durante 5 minutos y luego

sucrosa 0.12 M también por 5 minutos. En la presente investigación logramos desvitrificar 5 (20.00%) de excelente calidad y 11(44.00%) de buena calidad, muy probablemente debido a las diferentes concentraciones de los crioprotectores (0.25 M sucrosa por 5min y 0.5 M sucrosa por 5 min). Vásquez *et al.* (2007), desvitrificó 7 (87.5%) de buena calidad y 1 (12.5%) calidad regular, nuevamente se aprecia que varían las tasas en relación a los valores observables en la Tabla 6. Es notorio que los componentes químicos utilizados son determinantes para el éxito de la desvitrificación, es así, que Paredes (2014), utilizando etilenglicol y dimetilsulfoxido como crioprotectores logra desvitrificar 10 embriones (41.6%) de calidad excelente, 4 (16.7%) calidad buena y 5 (20.8%) de calidad regular.

Tabla 7. Asociación entre calidad embrionaria a la vitrificación y desvitrificación

		Calidad del embrión desvitrificado			Total	χ^2 (p<0.05)
		Excelente	Bueno	Regular		
Calidad del embrión vitrificado	Excelente	4	4	0	8	0.001
	Bueno	1	7	4	12	
	Regular	0	0	6	6	
Total		5	11	10	26	

En la Tabla 7 se puede observar que existe asociación estadística (p<0.01) entre la calidad embrionaria a la vitrificación y desvitrificación, esto quiere decir que es muy importante cuidar la condición del embrión desde la recuperación hasta efectuar la transferencia.

4.3 Tasa de viabilidad de embriones de alpaca

En la Tabla 8 se observa que únicamente los embriones de calidad excelente, logran que se produzca la preñez, sin embargo, solo llega la misma al 60%. Existe asociación estadística entre la calidad del embrión desvitrificado y la condición de preñez ($p < 0.01$).

Tabla 8. Asociación entre calidad del embrión y la condición de preñez.

		Condición de preñez lograda con el embrión descongelado			Total	%	χ^2 ($p < 0.05$)
		Si (P) Recuento	No (V) Recuento				
Calidad del embrión descongelado	Excelente	3	2	5	60.0	0.001	
	Bueno	0	11	11	0.0		
	Regular	0	10	10	0.0		
Total		3	23	26	11.5		

P: preñada; V: vacía

Vásquez *et al.* (2007), obtienen un resultado no satisfactorio en la transferencia embrionaria a alpacas receptoras. Ninguna alpaca quedó preñada a pesar que se utilizó embriones de calidad excelente. En el caso nuestro obtuvimos 3/5 (60%) de animales preñados (Tabla 8). Como mencionamos anteriormente esta diferencia podría deberse a las diferentes concentraciones y calidades de los crioprotectores utilizados. De la revisión se puede abstraer que solo con embriones de calidad excelente se puede obtener tasas aceptables de preñez (Abe *et al.*, 2002). Otro trabajo es el de Paredes (2014), quien obtuvo una tasa de preñez de 58.3% (7/12) con embriones excelentes viables post desvitrificación con etilenglicol y 37.5% (3/8) para los post-descongelados usando dimetilsulfóxido.

V. CONCLUSIONES

El protocolo de vitrificación de embriones de alpacas (*Vicugna pacos*) diseñado con base al protocolo de vitrificación de embriones de bovinos (*Bos taurus*) obtenidos por superovulación, mediante la hormona gonadotropina coriónica equina (eCG), es viable.

El éxito del proceso de vitrificación depende de la calidad de embriones de alpaca recolectados, únicamente deberían de considerarse los embriones de calidad excelente, ya que durante el proceso de vitrificación y desvitrificación los embriones tienden a perder calidad.

La viabilidad de los embriones de alpaca desvitrificados y transferidos a llamas en el C.I.P. Quimsachata del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), solo fue posible con aquellos clasificados como de calidad excelente, llegando a una tasa de preñez del 60%.

VI. RECOMENDACIONES

Las instituciones de educación universitaria y otras dedicadas a la investigación deberían de profundizar el conocimiento sobre los procesos de vitrificación de embriones en alpacas.

Es aconsejable que en todos los trabajos de congelamiento de embriones, los investigadores pongan especial cuidado, brindar una adecuada alimentación a los animales y de esta forma se tenga éxito en la transferencia de embriones.

Trabajar en el área de biotecnología de la reproducción, exige que los investigadores y técnicos de campo tengan un buen conocimiento de todo el procedimiento de vitrificación para disminuir el riesgo de alterar cualquier paso y fracasar en la vitrificación y desvitrificación del embrión.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aba M.; Forsberg M.; Kindahl H.; Sumar J.; Edqvist L.1995.** Endocrine changes after mating in pregnant and non-pregnant llamas and alpacas. *Acta Vet. Scand.* 36, 489-498.
2. **Aba M.; Kindahl H.; Forsberg M.; Quiroga M.; Auza N. 2000.** Levels of progesterone and changes in prostaglandin “F” release during luteolysis and early pregnancy in llamas and the effect of treatment with flunixinmeglumine. *Anim. Reprod. Sci.*, 59: 87-97.
3. **Abdalla H.; Shimoda M.; Hara H.; Morita H.; Kuwayama M.; Hirabayashi M.; Hochi S. 2012.** Vitrification of ICSI- and IVF-derived bovine blastocysts by minimum volume cooling procedure: effect of developmental stage and age. *Theriogenology*, 74: 1028-1035.
4. **Abe H.; Yamashita S.; Satoh T.; Hoshi, H. 2002.** Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol. Reprod. Dev.*, 61: 57-66.
5. **Adams G.; Sumar J.; Ginter O. 1990.** Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *J. Reprod. Fertil.*, 90: 535-545.
6. **Adams G.P.; Sumar J.; Ginther O.J. 1991.** Form and function of the corpus luteum in llamas. *Anim. Reprod. Sci.*, 24: 127-138.
7. **Adams G. 2001.** Comparative aspects of follicular dynamics in camelids. En: *Rev. Inv. Vet. Perú. Suplemento 1. XXIV Reunión científica APPA. Lima. pp. 142-146.*

8. **Adams G.; Ratto M. 2001.** Reproductive biotechnology in South American Camelids. En Resúmenes de la XXIV Reunión Científica Anual Peruana de Producción Animal (APPA). Lima – Perú.
9. **Albarracín J.L. 2005.** Vitricación de ovocitos bovinos mediante la técnica Open Pulled Straw: estudio estructural de cromosomas, microtúbulos y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario *in vitro*. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
10. **Ali J.; Shelton J.N. 1993.** Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98: 459-465.
11. **Aller J. 1998.** Reproducción en camélidos sudamericanos. Capítulo de libro IX. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Balcarce-Argentina.
12. **Aller J.F.; Rebuffi G.E.; Cancino A.K. 2002.** Superovulación response to progesterone-eCG treatment in vicugna (*Vicugna vicugna*) in semicaptive conditions. *Theriogenology*, 57: 576.
13. **Andorno R. 1993.** ¿El embrión humano merece ser protegido por el derecho?. Cuadernos de bioética, Vol. 4, N° 15, 1993, pp. 39-48.
14. **Arav A.; Yavim S.; Zeron Y.; Natan D.; Dekel L.; Gacitua H. 2002.** New trends in gamete's cryopreservation. *Mol. Cell. Endocrinology*, 187: 77-81.
15. **Avila P.L.M.; Madero J.I.; Lopez C.; León M.F.; Acosta L.; Gómez C.; Delgado L.G.; Gómez C.; Lozano J.M.; Reguero M.T. 2006.** Fundamentos de criopreservación. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.*, 45 (4): 292-300.
16. **Ball G.D.; Coulan C.B.; Fiel C.S.; Harms R.W.; Thie J.T.; Byers A.P. 1985.** Effects of serum source on human fertilization and embryonic growth parameters *in vitro*. *Fértil steril.* 44: 75-79.

17. **Barreda J.E. 1991.** La alpaca y sus problemas en la zona nororiental del departamento de Puno. En: seminario-taller: La alpaca, ventaja comparativa peruana. Fundación para el Desarrollo del Agro, Lima-Perú.
18. **Bourke D.; Adam C.; Kyle C.; Young P.; Mc Evo T.G. 1992a.** Ovulation, superovulation and embryo recovery in llamas. Procc. 12th Congress on Animal Reproduction, Vol. 1 The Hague, 23-27 August. pp. 193-195.
19. **Bourke D.A.; Adam C.L.; Kyle C.E.; Young P.; Mc Evo T.G. 1992b.** Superovulation and embryo transfer in the llama. En: Allen W.R.; Higgins A.J.; Mayhew I.G.; Snow D.; Wade J.F. (Eds), Proceedings of the First International Camel Conference. R&W Publications, Newmarket. 183-185.
20. **Bourke D.A.; Kyle C.E.; Mc Evoy T.G.; Young O.; Adam C.L. 1995a.** Superovulatory responses to eCG in llamas (*Lama glama*). Theriogenology, 44, 255-268.
21. **Bourke D.A.; Adam C.L.; Kyle C.E.; Young P.; Mc Evoy T.G. 1995b.** Recipient synchronization, and embryo transfer in South American Camelids. Theriogenology, 43, 171.
22. **Boutron P.; Peyridieu J. 1994.** Reduction in toxicity for red blood cells in buffered solutions containing high concentrations of 2, 3 butandiol by trehalose, sucrose, sorbitol, or mannitol. Cryobiology, 31: 367-373.
23. **Bravo W.; Johnson L. 1994.** Reproductive physiology of the male camelid. En: Llama medicine. Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice. 10: 259 – 264.
24. **Bravo W.M.; Tsutsui T.; Lasley B.L. 1995.** Dose response to equine chorionic gonadotropin and subsequent ovulation in llamas. Small Rumin. Res. 18: 157-163.

25. **Bravo W.M.; Moscoso J.; Ordoñez C.; Alarcon V. 1996.** Transport of spermatozoa and ovarian in female alpaca. *Anim.Reprod. Sci.*, 43: 2-3.
26. **Bravo W.; Skidmore J.; ZhaoX. 2000.** Reproductive aspects and storage of semen. *Camelidae Animal Reproduction Science*, 62: 173-193.
27. **Bravo W. 2002.** The reproductive process of South American Camelids. Ed. Framagann Graphics, Patti Eddington. UT. USA. 100 p.
28. **Brenes E.; Madrigal K.; Perez F.; Valladares K. 2001.** El cluster de los camélidos en Perú: Diagnóstico competitivo y recomendaciones estratégicas. Instituto Centroamericano de Administración de Empresas, INCAE. pp. 71–80.
29. **Brown B. 2000.** A review on reproduction in South American Camelids. *Anim. Reprod. Sci.*, 58: 169-195.
30. **Bustinza V. 2001.** La alpaca, conocimiento del gran potencial andino. Libro 1. Oficina de Recursos de Aprendizaje, Univ. Nacional del Altiplano. Puno. 496 p.
31. **Bud R. 2007.** Penicillin: triumph and tragedy. The Brand in the Era of Propaganda. Oxford University Press. ISBN 0-19-925406-0.
32. **Casas H. 1962.** Aspectos histológicos del testículo de la alpaca (*Lama pacos*). Tesis Bachiller, Fac. Med. Vet. U.N.M.S.M., Lima, Perú, 21 p.
33. **Cervantes M.F.; Huanca W.L.; Gonzales M.C.; Palomino M.C.; Leyva V.V. 2011.** Relación entre el día de colección y la recuperación de embriones en alpacas superovuladas *Rev. Investig. Vet. Perú*, 22 (2): 125-132.
34. **Celestinos M.; Gatica R. 2002.** Vitricación como técnica de criopreservación de embriones bovinos. *Arch Med.Vet.*, 34: 157 – 165.
35. **Correa J.; Ratto M.H.; Gatica R. 1997.** Superovulation in llamas (*Lama glama*) with FSH and equine chorionic gonadotrophin used individually or in combination.

- Animal Reproduction Science, 46: 289-296.
36. **Correa J.; Ratto M H.; Gatica R. 1994.** Actividad estral y respuesta ovárica en alpacas y llamas tratadas con progesterone y gonadotropinas. Arch. Med. Vet., 26: 59-64.
 37. **Critser J.K.; Agca Y.; Gunasena K.T. 1997.** The cryobiology of mammalian oocytes. En: Karrow A.M., Critser J.K. (editors). Reproductive tissue banking. San Diego: Academic Press. pp. 332-358.
 38. **Chávez M.; Aba M.; Agüero A.; Egey J.; Berestin V.; Rutter B. 2002.** Ovarian follicular wave pattern and the effect of exogenous progesterona on follicular activity in non-mated llamas. Anim. Reprod. Sci., 69 (1-2): 37-46.
 39. **Chuna P.; Leyva V.; Franco V. 1999.** Adherencias pene, prepuciales y niveles de testosterona circulantes en alpacas. Rev. Inv.Vet. Peru. 10(2): 11 – 16.
 40. **Drasner K. 1997.** Lidocaine spinal anesthesia: A vanishing therapeutic index. Anesthesiology. 87: 469
 41. **De Carolis G. 1987.** Descripción del sistema ganadero y hábitos alimentarios de camélidos domésticos y ovinos en el bofedal de Parinacota. Tesis de licenciatura, Fac. de Ciencia Agraria y Forestal, Universidad de Chile, 261 p.
 42. **Dobrinsky J. 1996.** Cellular approach to cryopreservation of embryos. Theriogenology, 45: 17-26.
 43. **Dochi O.; Takakura H.; Imai K. 1990.** Transfer of bovine embryos cryopreserved by vitrification. Japanese J. of Anim. Repr., 36: 69-72.
 44. **Donnay I.; Auquier P.; Kaidi S.; Carolan C.; Lonergan P.; Mermillod P.; Massip A. 1998.** Vitrification of *in vitro* produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. Anim. Repr. Sci., 52: 93-104.

45. **Elwishy A.B. 1992.** Functional morphology of the ovaries of the dromedary camel. In: Allen W.R., Higgins A.J., Mayhew I.G., Snow D.H.; Wade J.F. (Eds), Proc. Inst Camel Conf. R&W Publications (Newmarket), UK. pp: 149-154.
46. **Escobar R.C. 1984.** Mating, parturition. In: Hennig, R. (Ed.), the llama, animal breeding and production of South American Camelids. Talleres Gráficos de Abril, Lima-Perú. pp: 358, 103-139; 229-247.
47. **England B.G.; Foote W.C.; Cardozo A.G.; Matthews D.H.; Riera S. 1971.** Oestrus and mating behaviour in the llama (*Lama glama*). Anim. Behav. 19: 722-726.
48. **Fernández B.S.; Hansel W.; Novoa C. 1970.** Corpus luteum function in the alpaca. Biol. Reprod., 3: 252-261.
49. **Fernández B.S. 1971.** La alpaca, reproducción y crianza. Boletín de Divulgación N° 7. IVITA. UNMSM, Lima-Perú. pp: 14-38.
50. **Fernández B.S.; Madden D.H.L.; Novoa C. 1972.** Comportamiento sexual de la alpaca macho frente a la renovación de las hembras. Revista Inv. Pecuarias (Perú). 1(2): 115-128.
51. **Fernández B.S.; Sumar J.; Novoa C.; Leyva, V. 1973.** Relación entre la ubicación del cuerpo lúteo y la localización del embrión en la alpaca. Revista Invt. Pecuarias, 2 (2): 131-135.
52. **Fernandez B.S. 1993.** Manipulation of reproductive function in male and female. Anim. Reprod. Sci., 33: 307-323.
53. **Fernández F.; Hernández J.E.; Romero J.G.; Rodríguez J.L. 2013.** Viability after vitrification of sow and sheep embryos produced *in vitro*. Rev. Salud Animal, 35 (1): 52-58.

54. **Fowler M.E.; Bravo P.W. 1998.** Reproduction. In: Fowler, M.E. (Ed), *Medicine and surgery of South American Camelids*. Second ed. Iowa State University Press, Ames, USA. pp. 381-429.
55. **Fowler M.E. 1989.** *Medicine and surgery of South American Camelids*. Llama, alpaca, vicuña, guanaco. Iowa State University Press, Estados Unidos.
56. **Franco E.; Sumar J.; Varela M. 1981.** Eyaculación en la alpaca (*Lama pacos*). IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Corporación Nacional Forestal. Instituto de la Patagonia, Chile, Punta Arenas, pp. 22-27.
57. **Franklin W.L. 1993.** Contrasting socioecologies of South America`s wild camelids: The vicuña and the guanaco, Eisenbery, J.F.; Kleinman, D.G. (Eds), *Advances in the study of mammalian behaviour*. Am. Soc. Mammal., 7: 573-629.
58. **González M.F.; Manns J.; Murphy B.D. 1978.** FSH and LH activity of PMSG from mares at different stages of gestation. *Anim. Reprod. Sci.*, 1: 137-144.
59. **Guilbride P.D.L.; Moro M. 1965.** Mating behaviour in alpacas. *Veternary Institute for Tropical and High Altitude Research Quarterly Review (October-December)*.8.
60. **Hafez E. 1996.** *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 6ª ed. México: Interamericana McGraw – Hill. 525 p.
61. **Hafez E.S.E.; Hafez B. 2002.** *Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ma. Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V. México.
62. **Heath T. 1990.** The identification and selection of embryos. *Proc. 7th seminar of the dairy cattle society of the new zeland*, pp.43-60.
63. **Huanca W.L. 2005.** Aplicación de biotecnologías reproductivas en especies domésticas y silvestres de camélidos sudamericanos. *Agrociencia*, Vol. IX N° 1 y 2,

pp. 505-509.

64. **Huanca T. 2008.** Efecto de la administración de gonadotropinas exógenas (FSH y eCG en la respuesta ovárica y la producción de embriones en alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela. España.
65. **Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). 2012.** IV Censo Nacional Agropecuario. Lima-Perú.
66. **Isachenko V.; Soler C.; Isachenko E.; Perez-Sanchez F.; Grishchenko V. 1998.** Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology*, 36(3): 250-253.
67. **Johnston L.W. 1988.** Llama reproduction. In: Johnston, L.W. (Ed.), (*Llama glama*) Medicine Workshop for Veterinarians. Colorado State University, For Collins, Appendix 10b.
68. **Kadwell M.; Fernández M.; Stanley H.; Baldi R.; Wheeler J.C.; Rosadio R.; Bruford M.W. 2001.** Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and alpaca. *Proceedings of the Royal Society of London B* 268: 2575-2584.
69. **Kasai M. 1996.** Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, 42: 67-75
70. **Knight T.W.; Death A.; Wyeth T.; Hill F. 1992.** Effects of GnRH and of single versus multiple mating on the conception rate in alpacas. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 52: 311-312.
71. **Koford C.B. 1957.** The vicuña and the Puna. *Ecol. Monogr.*, 27: 153–219.
72. **Kuleshova LL.; Macfarlane D.R.; Trouson A.O.; Shaw J.M. 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 (2): 119-130.
73. **Lattanzi M.; Santos C.; Chaves G.; Miragaya M.; Capdevielle E.; Judith E. 2002.** Cryopreservation of llama (*Lama glama*) embryos by slow freezing and vitrification. *Theriogenology*, 57: 585 (abstract).
74. **Lauria A.; Genazzani A.N.; Oliva O.; Inaudi R.; Cremonesi F.; Monittola C.; Aureli G. 1982.** Clinical and endocrinological investigations on superovulation induced in heifers by human menopausal gonadotrophin. *J. Reprod. Fétil.*, 66 (1): 219-225.
75. **Larico J. 1987.** Influencia de la alimentación en la reproducción de la alpaca. *ALLPAK'A, Revista de Investigaciones Sobre Camélidos Sudamericanos*. 1 (3): 9-45.
76. **Leyva V.; García W. 1999a.** Efecto de la progesterona exógena sobre la función del cuerpo lúteo de alpacas. Resúmen del II Congreso Mundial de Camélidos. Cusco-Perú. pp. 87.
77. **Leyva V.; García W. 1999b.** Efecto de la prostaglandina sobre la vida del cuerpo lúteo en alpacas. II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco-Perú. pp. 88.
78. **Liebermann J.; Nawroth F.; Isachenko V.; Isachenko E.; Rahimi G.; Tucker M. 2002.** Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod* 67(6): 1671-1680.
79. **Losno W.; Coyutupa J. 1981.** Niveles de testosterona sérica post coito en alpacas adultas. Resúmen. Proyect. Invest. realizadas por la UNMSM. 1975 – 1979. 2: 114.
80. **López B.M.; López G.F. 2002.** Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. *Theriogenology*, 58: 1541-1552.

81. **Maqueda A. 2000.** Efecto de la aplicación de cloprostenol sódico sobre la tasa de fertilidad en un rebaño de selección de merino precoz. Reproducción XXV. Comunicado 12.
82. **Marín J.C.; Zapata B.; González B.A.; Bonacic C.; Wheeler J.C.; Casey C.; Bruford M.W.; Palma R.E.; Poulin E.; Alliende M.A.; Spotorno A.E. 2007.** Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular. Rev. Chil. de Hist. Nat., 80: 121-140.
83. **Martínez N.N.; Pinzón J.E.; Porras J.L.; Pérez N.J.; Buitrago E.R.; Zambrano J.L.; Jiménez C. 2014.** Criopreservación de embriones equinos y primer reporte de un potro de raza criolla colombiana nacido por transferencia de un embrión equino vitrificado. Rev. Med. Vet., 27: 21-31.
84. **Martino A.; Songsasen N.; Leibo S.P. 1996.** Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. Biol. Reprod., 54 (5): 1059 – 1069.
85. **Mayta C.C.; Loza M.M.G.; Delgado C.P.A. 2016.** Caracterización del aparato reproductor de llamas (*Lama glama Linnaeus 1758*) machos en Turco Provincia Sajama Departamento de Oruro. J. Selva Andina Anim.Sci., 3(1): 22-42.
86. **Mendoza G.; Castro A.; Lupidio M.; Domínguez M.; Gómez S.; Ghezzi M. 2012.** Características macroscópica y microscópica de las glándulas anexas del aparato reproductor de la llama (*Lama glama*). Rev. Investig.vet.Perú, 23 (1): 27-42.
87. **Molina J. 1782.** Saggio sulla storia naturale del Chili. Tommaso d'Aquino, Bologna, Italy. 306 p.
88. **Morató R.; Izquierdo D.; Paramio M.T.; Mogas T. 2012.** Survival and apoptosis

- rates after vitrification in cryotop devices of *in vivo*, produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. *Reproduction, Fertility and Development*, 22: 1141-1147. .
89. **Müller P.L.S. 1776.** Erste classe, säugende thiere. En: Des Ritters Carl von Linné vollständiges Naturalsystem nach der zwölften Lateinischen Ausgabe, 1773-1776: pp. 1-62, + 3 pls., Suppl., 384 p., Register, 36 unnumbered pp. + 536 p.
 90. **Navidi W. 2006.** Estadística para ingenieros y científicos. Ed. Mc Graw Hill/Interamericana. México, pp. 623-659.
 91. **Novoa C.; Sumar J. 1968.** Colección de huevos *in vivo* y ensayo de transferencia en alpacas. Boletín extraordinario IVITA – UNMSM, Lima-Perú, 3: 31 – 34.
 92. **Novoa C. 1970.** Reproduction in the camelidae. *J Reprod. Fert.*(review), 22: 3-20.
 93. **Novoa C.; Leyva V. 1996.** Reproduction en alpacas y llamas. Publicación científica. IVITA 26 (30): 3 – 18.
 94. **Novoa C.; Franco E.; García W.; Pezo D. 1999.** Dosis de gonadotropinas (eCG y hCG), superovulación y obtención de embriones en alpacas. *Rev. Inv. Pec. Perú*, 10(1): 48-53.
 95. **Nowak R. 1991.** Walker’s mammals of the world. Fifth edition. The John Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, USA. 1362 p.
 96. **Núñez A.; Morales C.M.; Rivera M.E.; Gonzáles A.L. 2006.** Aminoglucósidos ¿Cuándo y por qué usar en monodosis?. *Hospital clínico quirúrgico general. Rev. Cub. Med.*, 45 (3): s/p.
 97. **Paynter S.J.; Cooper A., Fuller B.J.; Shaw R.W. 1999.** Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture *in vitro*. *Cryobiology*, 38(4): 301-309.

98. **Palasz A.; Adams G.; Brogliatti G.; Mapletofl R. 2000.** Effect of collection and of permeating cryoprotectans on llama (*Lama glama*) embryos and trophoblastic vesicles. *Theriogenology*, 53 (1): 341.
99. **Papkoff H. 1978.** Relationship of PMSG to the pituitary gonadotrophins. En: *Control of reproduction in the cow*. Ed: J.M. Srrenan. Martín Nijhoff, The Hague. pp. 73-86.
100. **Paredes A.F. 2014.** Efecto de la congelación en la sobrevivencia y viabilidad de embriones de alpaca. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional del Altiplano, Puno-Perú.
101. **Pollard J.; Littlejohn R.; Moore G. 1999.** Season al and other factors affecting the sexual behavior of alpacas. *Anim. Reprod. Sci.*, 37: 349 – 356.
102. **Pollard J.C.; Littlejohn R.P.; More G.H. 1995.** Seasonal and other factors affecting the sexual behaviour of alpacas. *Anim. Reprod. Sci.*, 37: 349-356.
103. **Pumayalla A.; Leyva C. 1988.** Production and technology of alpaca and vicuña fleece. *Proceedings of the 1 edi. International symposium on speciality fibres, DWI, Aacen*, pp. 234-241.
104. **Quispe M.E.J. 2015.** Respuesta ovariva y recuperación de embriones por efecto de dosis de gonadotropina corionica equina (eCG) en alpacas. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional del Altiplano, Puno-Perú.
105. **Ratto M.H.; Berland M.; Huanca W.; Singh J.; Adams G.P. 2005.** *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes. *Theriogenology*, 63: 2445 –2457.
106. **Rall W.; Fahy G. 1985.** Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313: 573-575.
107. **Renieri C.; Valbonesi A.; La Manna V.; Antonini M.; Asparrin M. 2009.**

- Inheretance of Suri and Huacaya type of fleece in Alpaca. Ital. J. Anim. Sci., 8: 83-91.
- 108.**Roche J.F.; Ireland J.J. 1984.** Manipulation of ovulation in cattle. Proc.10th Int. Congr. Reprod. A. I. Urbana - Champaing. Vol IV, 9-17. San Martín M (1961): Fisiología de la reproducción de la alpaca, Anim. Symp. Sobre problemas ganaderos. Lima-Perú. pp. 121- 131.
- 109.**Sato A.; Montoya L. 1990.** Aparato reproductor de la alpaca (*Lama pacos*), Anatomía macroscópica. Rev. Camélidos Sudamericanos, 7: 5-14.
- 110.**Saito N.; Imai K.T. 1994.** Effect of sugar-addition on the survial of vitrified bovine blastocysts produced *in vitro*. Theriogenology, 41: 1053-1060.
- 111.**Saito N.; Imai K.T. 1997.** The effect of addition of various monosacharides to vitrification solution on the survival of bovine blastocysts produced *in vitro*. Cryobiology and Cryotecnology, 43: 34-39.
- 112.**Saito N. 2001.** Método de vitrificación. NLBC. Tokio, Japón.
- 113.**Saha S.O.T.; Takagi M.; Boediono A.; Sumantri C.; Suzuki T. 1996.** Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos u sing ethylene glicol, thehalose, polyvinylpyrrolidone. Cryobiology, 33: 291-299.
- 114.**San Martín M.; Copaira M.; Zuñiga J.; Rodríguez R.; Bustinza G.; Acosta L. 1968.** Aspects of reproduction in the alpaca. J. Reprod. Fertility.16: 395-399.
- 115.**Shaw J.; Wart C.; Trounson A. 1995.** Evaluation of propanediol, ethyleneglycol, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow-cooled mouse pronuclear and 4 cell embryos. Hum. Reprod., 10(2): 396-402.
- 116.**Shaw J.; Kuleshoval LL.; Macfarlane D.; Trounson A. 1997.** Vitrification properties of solutions of ethyleneglycol in saline containing pvp, ficoll, or dextran.

- Cryobiology, 35(3): 219-229.
117. **Shaw J.M.; Oranratnachai A.; Trounson A.O. 2000.** Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53 (1): 59-72.
118. **Smith T.M. 1985.** Reproduction in South American Camelids. *Iowa State Univ. Vet*, 47: 110-115.
119. **Sirard M.A.; Coenen K.; Bilodeau S. 1992.** Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology*, 37: 39–57.
120. **Schneider U.; Mazur P. 1984.** Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen–tawed embryos. *Theriogenology*, 21 (1): 68-79.
121. **Schams D.; Menzer C.; Schallenberger E.; Hoffman B.; Hahn J.; Hahn R. 1978.** Some studies of the pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine reponses after application for superovulation in cattle. En: *Control of reproduction in the cow*. Ed: J.M. Sreenan. Martin Nijhoff, The Hague. pp. 122-142.
122. **Sommerfeld V.; Niemann H. 1999.** Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylenglicol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*, 38: 95-105.
123. **Stringfellow D.A.; Sidel S.M. 2000.** Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS): Guía de procedimientos e información general para el uso de la tecnología de la transferencia de embriones con especial énfasis en los procedimientos sanitarios. Editorial. International Embryo Transfer Society, 2da Edición. España.
124. **Sumar J. 1985.** Algunos aspectos obstétricos de la alpaca. *Bol. Tec.* 2.

125. **Sumar J. 1988.** Removal of the ovarios or ablation of the corpus luteum and its effect on the maintenance of gestation in the alpaca and llama. *Acta Vet. Scan.* 83: 133–141.
126. **Sumar J. 1996.** Reproduction in llamas and alpacas. *Anim. Rep. Sci.*, 42: 405–415.
127. **Sumar J.; Adams G. 1997.** Reproductive anatomy and physiology of the female llama. In: Youngquist, R.S. (Ed.), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. WB Saunders, Philadelphia. USA. pp. 792-798.
128. **Sumar J. 2007.** Realidades y mitos en los camélidos sudamericanos. XX Reunión Asociación Latinoamericana de Producción Animal (APPA) XXX Reunión Asociación peruana de Producción Animal (APPA). V Congreso Internacional de Ganadería de Doble Propósito. 21-25 octubre. Memoria. Cuzco-Peru
129. **Smith C.; Peter A.; Pugh D. 1994.** Reproduction in llamas and alpacas: A review. *Theriogenology*, 41: 201–209.
130. **Tibary A.; Anouassi A. 1997.** *Theriogenology in camelidae*. Actes Editions, Rabat, Morocco.
131. **Tobias K.M.; Marioni H.K.; Wagner R. 2006.** A retrospective study on the use of acepromazine maleate in dogs with seizures. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 42 (4): 283-289.
132. **Vajta G. 2000.** Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 357-364.
133. **Vaughan J.; MacMillan K.; D’Occhio M. 2004.** Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Anim. Reprod. Sci.*, 80 (4): 353-361.
134. **Vásquez M.; Cervantes M.; Cordero A.; Cárdenas O.; Huanca T.; Huanca W. 2007.** Vitrificación de embriones de alpacas: estudio preliminar. *Arch. Lat. Prod.*

Anim., 15 (supl. 1): 349.

135. **Vásquez M.; Cueva S.; Cordero A.; Gonzales M.L.; 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; 22 (3): 190-198.
136. **Vásquez M.E. 2008.** Evaluación de dos métodos de criopreservación de embriones sobre las tasas de sobrevivencia *in vitro* y preñez en llamas. Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima- Perú.
137. **Velásquez F.; Málaga J.; Bravo P.W. 1999.** Citología exfoliativa del útero de la alpaca. In: Libro de resúmenes II Congreso Mundial Sobre Camélidos, vol. 84 Cusco-Perú. (abstract).
138. **Wainwright M. 1991.** Streptomycin: discovery and resultant controversy. History and philosophy of the life sciences, 13 (1): 97-124.
139. **Weems C.W.; Weems Y.S.; Randel R.D. 2006.** Prostaglandins and reproduction in female farm animals. Vet. J., 17: 206-228.
140. **Wheeler J.C. 1984.** On the origin and early development of camelid pastoralism in the Andes. En: Clutton-Brock J.; Grigson C. (eds) Animals and archaeology. Volume 3: Early herders and their flocks: 395-410. British Archaeological Reports, BAR International Series 202, Oxford, United Kingdom.
141. **Wheeler J.C.; Chikhi L.; Bruford M.W. 2006.** Case study in genetics of animal domestication: South American Camelids. En: Zeder M.A.; Bradley D.G.; Emshwiller E.; Smith B.G (eds). Documenting domestication: new genetic and archaeological paradigms: 329-341. Univ. of Calif. Press, Berkeley, USA.
142. **Wieps W.D.; Chapman R.J. 1985.** Non-surgical embryo transfer and live birth in a llama. Theriogenology, 24: 251-257.

143. **Yang N.S.; Lu K.H.; Gordon I.; Polge C. 1992.** Vitrification of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology*, 37: 326 (Abstr.).
144. **Zeron Y.; Pearl M.; Borochoy A.; Arav A. 1999.** Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. *Cryobiology*, 38(1): 35-42.

ANEXOS

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Tabla 9. Ficha para el acopio de datos

Calidad del embrión recolectado

Nro. de arete	Excelente	Bueno	Regular	Malo

Calidad de embrión desvitrificado

Nro. de arete	Excelente	Bueno	Regular	Malo

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

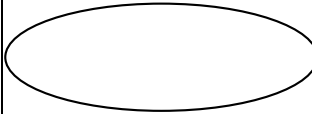
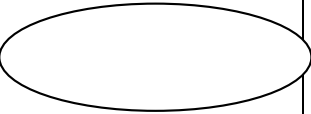
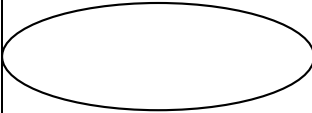
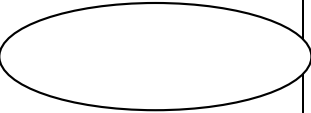


Tabla 10. Ficha de registro de información a nivel de campo

Arete:.....

Raza:.....

Color:.....Obs.:.....

Día	Ovario derecho	Ovario izquierdo	Observación
			
			

Observaciones:.....

.....

Día 0	Día 2	Día 6	Día 7	Día 13	Día 14
Ecografía + GnRH	eCG 650 UI	Ecografía + PF2alfa	Empadre	Ecografía	Lavado y recuperación de embriones

Figura 3. Protocolo de tratamiento hormonal



Figura 4. Selección, dosificación y aplicación de medicamentos en alpacas



Figura 5. Alimentación de la alpaca



Figura 6. Empadre y ecografía de alpacas hembras



Figura 7. Soluciones para embriones y aplicación de acepromazina maleato



Figura 8. Anestesia epidural, vaciado de heces y ecografía de la alpaca



Figura 9. Lavado uterino y recuperación de embriones



Figura 10. Filtración y observación del embrión



Figura 11. Vitrificación de embriones a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ mediante nitrógeno líquido

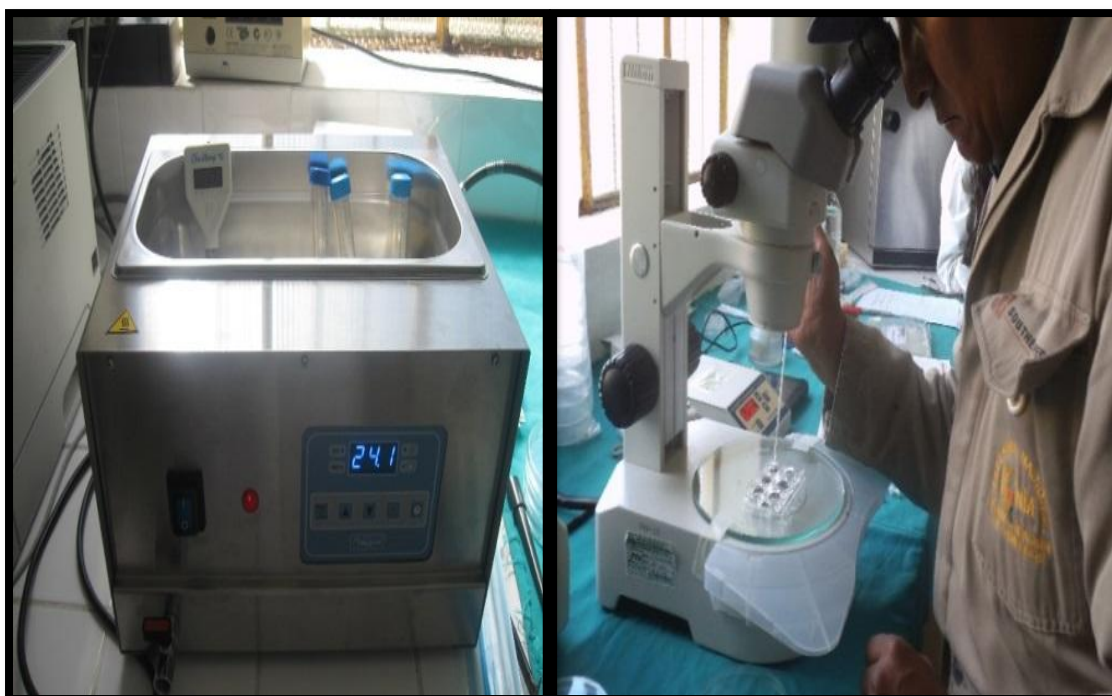


Figura 12. Baño María a $24.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y observación del embrión descongelado



Figura 13. Personal de apoyo del proyecto

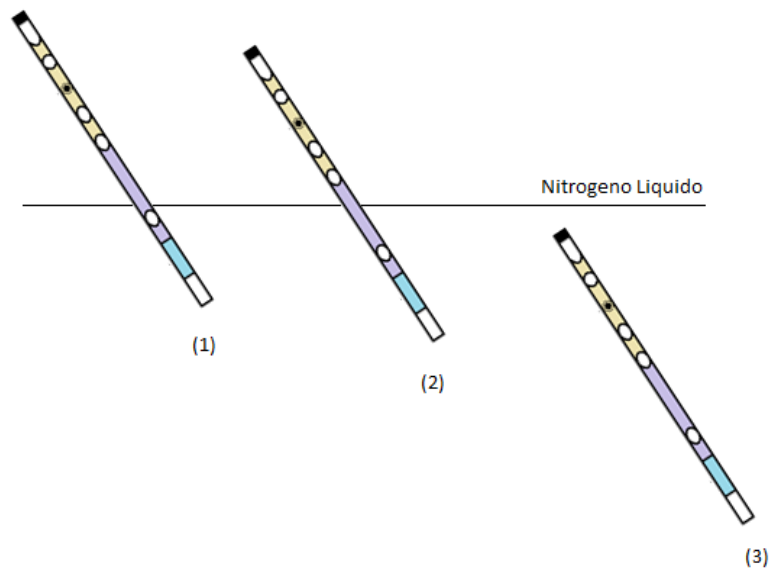


Figura 14. Pasos para la vitrificación del embrión en el tanque de nitrógeno

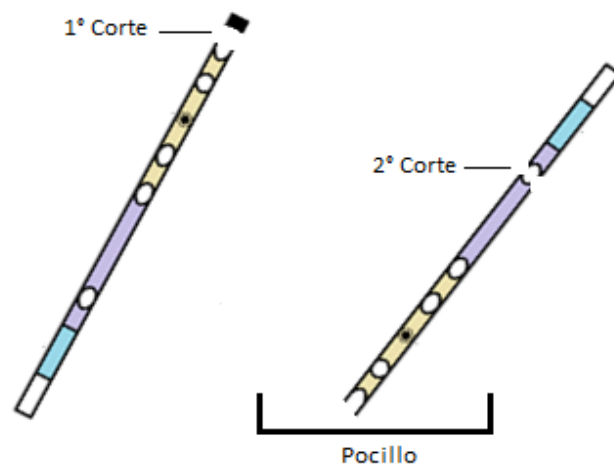


Figura 15. Pasos para la desvitrificación de embriones

Tabla 11. Pruebas de Chi-cuadrado de Pearson para determinar la asociación de la calidad del embrión recolectado vitrificado y desvitrificado

		Calidad del embrión desvitrificado
Calidad del embrión vitrificado	Chi cuadrado	18.279
	Gl	4
	Sig.	0.001

Tabla 12. Pruebas de Chi-cuadrado de Pearson para determinar la asociación de la calidad del embrión desvitrificado y la condición de preñez.

		Calidad del embrión desvitrificado
Preñez (si/no)	Chi cuadrado	14.243
	Gl	2
	Sig.	0.001

Tabla 13. Tamaño de folículos, según ubicación del ovario en alpacas antes del tratamiento

Ubicación del ovario	n	$\bar{x} \pm DS$ (mm)	C V (%)	Mínimo	Máximo
Derecho	14	8.8 ± 2.9	32.96	8	13
Izquierdo	17	8.6 ± 1.8	20.93	6	12

Tabla 14. Tamaño de cuerpos lúteos, según ubicación del ovario, antes del tratamiento hormonal en alpacas.

Ubicación del ovario	n	$\bar{x} \pm DS$ (mm)	CV (%)	Mínimo	Máximo
Derecho	14	10.2 ± 2.1	20.58	8	14
Izquierdo	17	10.1 ± 1.9	18.81	7	13

Tabla 15. Evaluación de la respuesta ovárica al tratamiento con hormona coriónica equina (eCG), según ubicación del ovario en alpacas.

Ubicación del ovario	n	$\bar{x} \pm DS$	C V (%)	Mínimo	Máximo
Derecho	29	4.00 ± 1.3	32.5	2	8
Izquierdo	30	4.73 ± 2.5	52.8	5	12

Tabla 16. Tamaño de folículos ováricos, en alpacas al usar la hormona coriónica equina (eCG).

Ubicación del ovario	n	$\bar{x} \pm DS$ (mm)	C V (%)	Mínimo	Máximo
Derecho	29	6.8 ± 2.3	33.82	4	12.6
Izquierdo	30	7.2 ± 1.5	20.83	5	11.0

Tabla 17. Número de cuerpos lúteos ováricos en alpacas al usar hormona coriónica equina (eCG).

Ubicación del ovario	n	$\bar{x} \pm DS$	C V (%)	Mínimo	Máximo
Derecho	27	4.00 ± 1.0	25	1	8
Izquierdo	28	5.21 ± 1.72	33	1	9

Tabla 18. Tamaño de cuerpos lúteos considerándose ambos ovarios en alpacas al usar la hormona coriónica equina (eCG).

Lado de ovario	n	$\bar{x} \pm DS$ (mm)	C V %	Mínimo	Máximo
Derecho	27	9.0 ± 2.95	32.78	5.8	17
Izquierdo	28	9.5 ± 3.33	35.05	5.7	20

Tabla 19. Tamaño de folículos considerándose ambos ovarios en llamas para la transferencia

Lado de ovario	n	$\bar{x} \pm DS$ (mm)	C V %	Mínimo	Máximo
Derecho	6	10.8 ± 1.8	16.67	9	14
Izquierdo	20	10.0 ± 2.5	25	7	14

Tabla 20. Tamaño de cuerpos lúteos considerándose ambos ovarios en llamas para la transferencia.

Lado de ovario	n	$\bar{x} \pm DS$ (mm)	C V %	Mínimo	Máximo
Derecho	6	11.5 ± 1.62	14.01	11	14
Izquierdo	20	11.7 ± 1.70	14.53	9	15

Vitrification Method

2001.02

By N.Saito, NLBC

(1) Composition of the Vitrification Solution

	Glycerol	Ethylene Glycol	Sucrose	Xylose	*PEG(w/v)
(1)	10 %	-	0.1 M	0.1 M	1 %
(2)	10	10 %	0.2	0.2	2
(3)	20	20	0.3	0.3	3

*PEG: Poly Ethylene Glycol (M.W.=8,000)

Basic solution is Dulbecco's PBS.

(2) Preparation of the solutions

1) Vitrification Solution

	Sucrose	Xylose	PEG	GL	EG	D-PBS
(1)	1.7115 g	0.7507 g	0.3 g	5 ml	-	up to 50 ml
(2)	3.4230	1.5013	1.0	5	5 ml	up to 50 ml
(3)	5.1345	2.2520	1.5	10	10	up to 50 ml

- ① Measure Sucrose, Xylose and PEG, and put them into 50-ml measuring flask for each solution.
- ② Add about 20 ml of D-PBS to each flask, and dissolve the sugars and PEG completely.
- ③ Add Glycerol and Ethylene Glycol. Glycerol is especially sticky and the final solution is also sticky because of the high concentration. Therefore, you can neither blow out nor rinse away the glycerol inside the pipette. Attaching the plastic pipette to the flask's neck and slow spontaneous dropping are recommended. Then, mix the solution well.
- ④ Finally the solution's volume is adjusted to 50 ml with D-PBS.
- ⑤ After mixed well, sterilize the solutions with 0.22 μ micron-filter.
- ⑥ The prepared solutions can be preserved in a refrigerator or a freezer. Long-preserved

Generated by CamScanner from intsig.com

solution should be mixed well before use.

2) Sucrose solution for dilution

Stock Solution (for 0.5 M Sucrose Solution)

Sucrose	10.697 g
D-PBS	up to 50 ml

- ① After dissolved, sterilize with micron-filter. This solution can be preserved in a refrigerator or a freezer.
- ② Just before use, prepare as below

	Stock Solution	D-PBS	Calf Serum
* 0.5 M-Sucrose	4	0	1 ml ⇒ A
0.25 M Sucrose	2	2	1
D-PBS+20% CS (Storage Medium)	0	4	1

- ③ After mixed, sterilize with micron-filter.

(3) Vitrification Procedures

1) Equilibration

(Temperature) Room Temperature 22 – 28 °C

Too high temperature is not recommended, because of the excessive permeation of the cryoprotectants.

2) Equilibration Steps

VS (1) ⇒ VS (2) ⇒ VS (3) ⇒ LN2

5 min. 5 min. 1 min. (including loading and heat-sealing)

- ① Embryo is transferred from VS(1), VS(2) then to VS(3) keeping the time interval.
- ② **Immediately** after transferred to VS(3), embryo should be loaded into 0.25 ml straw that had

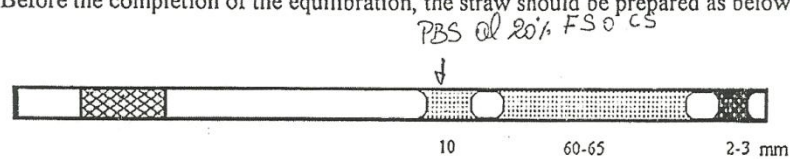
Generated by CamScanner from intsig.com

been prepared as below. The embryo must be in LN2 after one minute of the transfer.

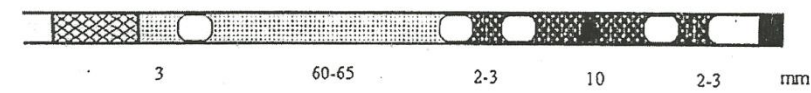
- ③ These equilibration steps can be carried out with the solutions that are put in 35 mm dishes or in larger dishes in the form of the drop.
- ④ The final step, from VS(2) to (3), and the loading are the most important. The embryo floats on the surface of the final solution, VS(3). The embryo should be transferred with very little volume of VS(2). Then the embryo is loaded to the straw from the surface of VS(3). As the time is limited, this step needs some skill.

3) Loading to the straw

Before the completion of the equilibration, the straw should be prepared as below.



(After the loading)



- * After the loading, the straw's end should be heat-sealed.
- * The air column is about 5 mm length.

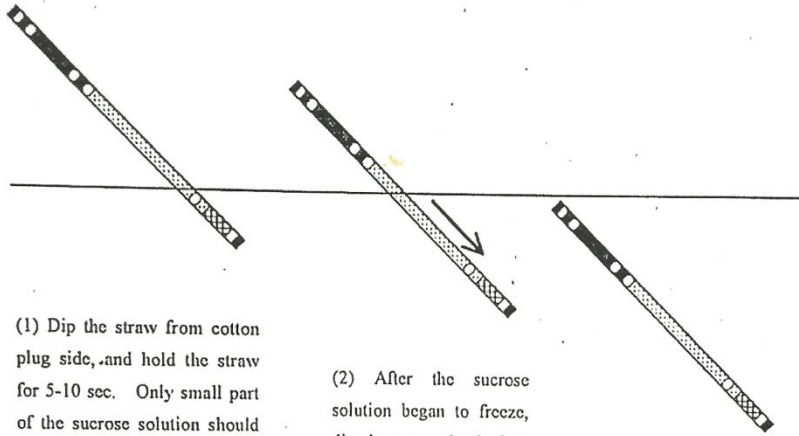
recomendación:

*en las soluciones (Sucrosa, PBS y VS₃) a T° ambiente.
El algado tiene que llegar hasta máximo la mitad.*

Generated by CamScanner from intsig.com

4) Plunging to LN2

After loading and heat sealed, the straw is slowly immersed into LN2 described as below. Make sure that the sucrose solution become white (frozen), while the vitrification solution stays transparent.



(1) Dip the straw from cotton plug side, and hold the straw for 5-10 sec. Only small part of the sucrose solution should be under LN2 at the time.

(2) After the sucrose solution began to freeze, dip the straw slowly into LN2.

(3) Plunge the whole straw into LN2.

(4) Dilution of Cryoprotectants

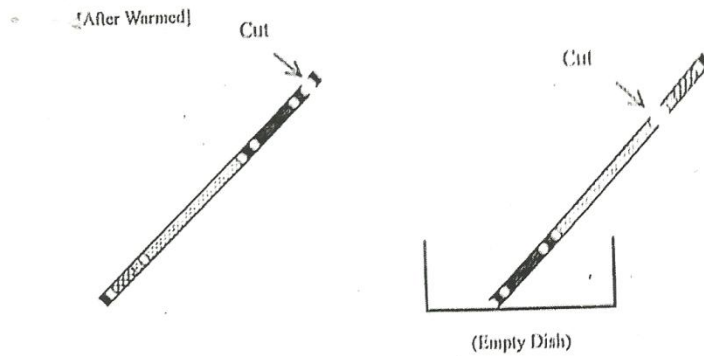
Using the loading method above, the vitrified embryo can be transferred with one-step straw method, which means the dilution of cryoprotectants inside the straw. But we have not yet tried transfer using this method. The dilution method outside straw is as follows.

1) Warming

- ① After the straw was taken out from LN2, hold it in the air 5-6 sec., then put it in 20°C water.
- ② Take out the straw from the water when the sucrose solution has melt, and cut the straw at the uppermost air column (cotton-plug side is downwards).
- ③ Attaching the cut edge to the surface of a empty dish, cut the straw again at the air column between cotton-plug and sucrose solution column. All solutions will be expelled to the empty dish and the vitrified embryo is automatically mixed with the sucrose solution.
- ④ Search the embryo under a stereo-microscope shaking and mixing the solution.

4

Generated by CamScanner from intsig.com



2) Dilution steps

Immediately after the embryo discovered, it should be transferred to 0.5 M sucrose solution, then to 0.25 M solution as follows.

0.5M Sucrose Solution (5 min.) \Rightarrow 0.25M Sucrose Solution (5 min.) \Rightarrow Storage Medium (D-PBS+20% CS)

[References]

1. Saito, N., K. Imai, M. Tomizawa : Effect of sugar-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology*, 41, 1053-1060, 1994
2. Saito, N., K. Imai : The effect of addition of various monosaccharides to vitrification solutions on the survival of bovine blastocysts produced in vitro. *Cryobiology and Cryotechnology*, Vol.43, No.1, 34-39, 1998
3. Shin-noh, M. et al. : Effect of in-vitro culture of bovine embryos biopsied with a microblade on in-vitro survival after vitrification. *Theriogenology*, 49, 227, 1998

5

Generated by CamScanner from intsig.com



PERÚ

Ministerio
de Agricultura

Instituto
Nacional de Innovación
Agraria

Estación
Experimental Agraria
Illpa

"Decenio de las Personas con Discapacidad en el Perú"
"Año de la Diversificación Productiva y del Fortalecimiento de la Educación"

CONSTANCIA

El que suscribe Jefe del Programa Nacional de Innovación en Camélidos del Instituto Nacional de Innovación Agraria.

Hace constar que:

Que el **Bach. M.V.Z. ALDO CASSA SALAS** ha ejecutado su tesis titulada "Vitrificación y calidad de embriones de alpaca (*Vicugna pacos*) recuperados por superovulación utilizando la hormona Gonadotropina coriónica equina (eCG)" en CIP Quimsachata de la Estación Experimental Illpa Puno – **INIA-Puno**, del 19 de enero al 30 de mayo del presente año.

Durante las actividades realizadas ha demostrado profesionalismo y responsabilidad en cada una de las tareas encomendadas.

Puno, 31 de agosto de 2015

INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN Agraria
ESTACIÓN EXPERIMENTAL ILLPA - PUNO



DR. TEODORO HUANCA MAMANI
LÍDER
Prog. Nac. de Innovac. Agraria
en Camélidos

www.inia.gob.pe
illpa@inia.gob.pe
thuanca@inia.gob.pe

Rinconada de Salcedo s/n – Puno
Carretera Puno Juliaca km 22 – Illpa
T: (051) 36-3812