

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES.

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MEDICO
VETERINARIO ZOOTECNISTA

TEMA:

**“EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES DE
ALPACA (*Vicugna pacos*) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA
DE LA REPRODUCCIÓN DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE
COTOPAXI”**

AUTORES.

Sarzosa Troya Mario Santiago

Culcay Troncoso Israel Hernán

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Edwin Pino

LATACUNGA – ECUADOR

2014

AUTORÍA

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales
Carrera de Medicina Veterinaria.

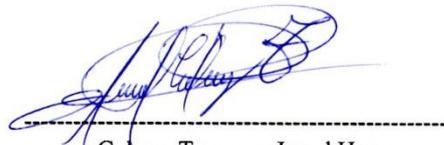
La responsabilidad de la investigación, ideas expuestas, resultados y conclusiones de la presente tesis pertenecen única y exclusivamente a los Autores, Cumpliendo con el compromiso investigativo, declaramos que mencionada investigación es de nuestra autoría. y el patrimonio intelectual de la misma a la UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI.

(Reglamento de Graduación de la U.T.C).

Postulantes:



Sarzosa Troya Mario Santiago
C.I. 050310013-3



Culcay Troncoso Israel Hernan
C.I. 180438614-4

CERTIFICACIÓN

Cumpliendo con el Reglamento del Curso Profesional de la Universidad Técnica de Cotopaxi, en calidad de Director de Tesis con el Tema: **“EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN INVITRO DE EMBRIONES DE ALPACA (Vicugna pacos) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI ”** propuesto por los alumnos ; Culcay Troncoso Israel Hernan y Sarzosa Troya Mario Santiago presento el **Aval Correspondiente** de este trabajo de tesis de grado.

Atentamente



Dr. Edwin Pino

Director de Tesis

Nosotros, Dra. Mercedes Toro, Dra. Janeth Molina y Dr. Miguel Gutiérrez, catedráticos y miembros del tribunal del trabajo de Tesis “**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN INVITRO DE EMBRIONES DE ALPACA (Vicugna pacos) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**” propuesto por los alumnos ; Culcay Troncoso Israel Hernan y Sarzosa Troya Mario Santiago, presentamos el Aval Correspondiente de este trabajo de tesis.

Atentamente



Dra. Mercedes Toro
Presidenta del Tribunal



Dra. Janeth Molina
Miembro Opositor



Dr. Miguel Gutiérrez
Miembro del Tribunal

AGRADECIMIENTO

Agradezco a DIOS por darme salud, vida y sabiduría para realizar este sueño tan anhelado y a mis queridos padres de manera infinita por el apoyo recibido durante toda vida.

De manera especial a la “Universidad Técnica De Cotopaxi”, por darme la oportunidad de prepararme en dicho establecimiento, a mis maestros quienes compartieron sus conocimientos durante mi trayectoria estudiantil. Especialmente al Dr. Edwin Pino por guiarme y apoyarme para realizar la presente investigación.

También agradezco de manera especial a mis amigos y amigas, con quienes compartimos momentos muy gratos durante mi travesía estudiantil.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera estuvieron involucradas para que este trabajo culmine con éxito.

Israel Culcay T.

AGRADECIMIENTO

Agradezco infinitamente y de corazón a mis padres que con su amor y comprensión me han guiado y apoyado incondicionalmente en todo el camino transcurrido en la vida estudiantil.

A mis hermanas Cristina y Verónica, que con su amor me han enseñado a salir adelante. Gracias por estar conmigo en las alegrías y adversidades de la vida. A mi hermano Santiago quien es mi inspiración y que sé que desde el cielo guía cada uno de mis pasos.

Un agradecimiento especial a la “Universidad Técnica De Cotopaxi” por haberme acogido durante toda mi carrera universitaria. A mis queridos maestros quienes compartieron sus conocimientos día a día durante mi trayectoria estudiantil y de manera muy especial al Dr. Edwin Pino quien supo guiarnos de la manera más acertada y así poder realizar la presente investigación.

También quiero dar las gracias a la Dra. Mercedes Toro Dra. Janeth Molina y Dr. Miguel Gutiérrez, por su colaboración tan valiosa en este proyecto.

Santiago Sarzosa T.

DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico con mucho cariño en primer lugar a Dios después a mis queridos padres, Julio Culcay y Martha Troncoso, quienes me apoyaron incondicionalmente en todas las etapas de mi vida, de manera económica y moral quienes me enseñaron que ante las adversidades de la vida hay que aprender a luchar y no darme por vencido para alcanzar lo que uno se propone en la vida.

También dedico con mucho cariño a mi Hermana Flora y a un primo Hermano Daniel porque él siempre ha estado conmigo en los momentos buenos y malos para apoyarme y darme aliento para seguir adelante a Isaías quien ha sido mi motivación de seguir en adelante.

Israel Culcay T.

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación lo dedico en primer lugar a DIOS y a mis padres Vicente Sarzosa y Cumanda Troya quienes con sus consejos, amor y paciencia me han impulsado a seguir adelante en toda mi vida estudiantil.

A mis maestros que en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida profesional, a todos y cada uno de ellos les dedico la presente tesis.

Santiago Sarzosa T.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	i
AUTORÍA	¡Error! Marcador no definido.
CERTIFICACIÓN	ii
AGRADECIMIENTO	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
DEDICATORIA	viii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS	xv
CAPITULO I	1
1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	1
1.1 Generalidades de la Alpaca.....	1
1.1.1 Características de la Alpaca	1
1.1.2 Alpacas en el Ecuador	3
1.2 ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA EN ALPACAS	4
1.2.1 Aparato reproductor en las hembras.....	4
1.2.1.1 Vulva.....	4
1.2.1.2 Vagina.....	4
1.2.1.3 Cérvix.....	5
1.2.1.4 Útero	5
1.2.1.5 Oviductos	5
1.2.1.6 Ovarios.....	5
1.2.1.8 Edad y peso a la pubertad	6
1.2.1.9 Ciclo sexual.....	6
1.2.1.10 Ovulación.....	7
1.2.1.11 Foliculogénesis	8
1.2.1.12 Folículos primordiales:	9
1.2.1.13 Folículo primario unilaminar:.....	10
1.2.1.14 Folículos secundarios:.....	10
1.2.1.15 Folículo terciario, maduro o de Graaf:.....	11
1.2.2 Órganos Reproductivos Masculinos.....	12
1.2.2.1 Escroto y testículos	12
1.2.2.2 Epidídimo y conducto deferente	12

1.2.2.3 Glándulas Accesorias.....	12
1.2.2.4 Pene y prepucio.....	12
1.3 Pubertad y edad al primer empadre.....	13
1.4 Espermatogénesis y características seminales	13
1.5 Método de colección de semen en alpacas.....	14
1.5.1 Vagina artificial.....	14
2. PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES.....	15
2.1 Características de la Técnica.....	16
3. SÚPER ESTIMULACIÓN OVÁRICA EN ALPACAS	17
3.1 Inhibición de la onda folicular.....	17
3.2 Hormonas utilizadas en camélidos para inducir súper-estimulación ovárica	17
3.3 Aspiración folicular mediante laparotomía.....	18
4. PREPARACIÓN DEL SEMEN QUE SE UTILIZA EN PIV DE EMBRIONES.....	20
4.1 Capacitación espermática.....	21
4.2 Cultivo in vitro de embriones.....	22
5. FERTILIZACIÓN IN VITRO.....	22
5.1 Calidad embrionaria.....	24
5.1.1 Categoría A: Embrión de óptima calidad con máxima capacidad de implantación y congelación.....	24
5.1.2 Categoría B: Embrión de buena calidad con elevada capacidad de implantación y congelación.....	24
5.1.3 Categoría C: Embrión regular con bajas posibilidades de implantación	24
5.1.4 Categoría D: Embrión de mala calidad con muy pocas posibilidades de implantación.....	24
5.2 Estadios embrionarios.....	24
5.2.1 Mórula	24
5.2.2 Mórula compacta.....	24
5.2.3 Blastocisto temprano.....	25
5.2.4 Blastocisto.....	25
5.2.5 Blastocisto expandido.....	25
5.2.6 Blastocisto eclosionado o liberado.....	25
CAPITULO II.....	26
6. METODOLOGÍA DEL ENSAYO.....	26
6.1 MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR.....	26

6.3 Ubicación del ensayo	26
6.4 Condiciones Meteorológicas	26
7. UNIDAD EXPERIMENTAL.....	27
7.1 Material experimental	27
7.2 Materiales de campo	27
7.3 Materiales de laboratorio.....	27
7.4 Medios:.....	28
7.5 Materiales para laparotomía Exploratoria de Ovario	29
7.6 Materiales de oficina	29
7.7 Métodos:.....	29
7.7.1 Inductivo.....	29
7.7.2 Descriptivo	29
8. DISEÑO ESTADÍSTICO	30
8.1. Variables Evaluadas	30
8.1.1 Fertilización:.....	30
8.1.2 Cantidad de embriones recuperados:.....	30
8.1.3 Calidad Embrionaria.....	30
9. MANEJO DEL ENSAYO.....	31
9.1 Preparación de los animales	31
9.2 Protocolo de súper estimulación ovárica.....	31
9.3 ENSAYO EN LABORATORIO.....	32
9.3.1 Día 1	32
9.3.1.1 Fase 1: Aspiración de ovocitos mediante Laparotomía exploratoria de ovario y preparación de medios	32
9.3.1.2 Fase 2: Observación de CCO y protocolo de maduración.....	33
9.3.2 Día 2	33
9.3.2.1 Fase 3: Extracción y Recolección del semen.....	33
9.3.2.2 Fase 4: Purificación de semen en percoll.....	34
9.3.2.3 Fase 5: Determinación de la concentración espermática y fertilización in vitro.....	34
9.3.2.4 Fase 6: Inseminación de los ovocitos maduros.....	36
9.3.2.5 Fase 7: Ovocitos fertilizados.....	36
CAPITULO III.....	37
10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
10.1 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	40
10.1.1 CONCLUSIONES.....	40

10.1.2 RECOMENDACIONES	41
10.2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
10.2.1 CITAS VIRTUALES	43
ANEXOS	47
.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA. 1.- Tiempo de cópula y características del semen de alpaca colectado con vagina artificial con el apoyo de un maniquí o de hembras receptoras.	15
TABLA. 2.- Categorización de ovocitos.....	20
TABLA. 3.- Protocolo de desparasitación y vitaminización	31
TABLA. 4.- Protocolo de súper estimulación ovárica en Alpaca.....	32
TABLA. 5.- Numero de espermatozoides por cuadrante.....	35
TABLA. 6.- Obtención de Ovocitos	37
TABLA. 7.- Maduración de ovocitos	38
TABLA. 8.- Inseminación y fertilización de ovocitos.....	39
TABLA. 9.- Producción de embriones	39

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO. 1.- Área de distribución de Camélidos	2
GRÁFICO. 2.- Población de alpacas a nivel mundial	3
GRÁFICO. 3.- Anatomía del aparato reproductor de la hembra	6
GRÁFICO. 4.- Diagrama de las estructuras del ovario (Folículo madurando (f), óvulo (ov), cuerpo lúteo (cl)).....	8
GRÁFICO. 5.- Desarrollo folicular	9
GRÁFICO. 6.- Folículo primordial.....	9
GRÁFICO. 7.- Folículo primario unilaminar	10
GRÁFICO. 8.- Folículo secundario	11
GRÁFICO. 9.- Esquema del folículo de graff	11
GRÁFICO. 10.- Anatomía del Aparato Reproductor del Macho.	13
GRÁFICO. 11.- Aspiración folicular vía laparotomía luego del tratamiento de súper estimulación.....	19
GRÁFICO. 12.- Representación gráfica de Cuadrantes de Cámara de Neu Bauer para conteo espermático.....	35
GRÁFICO. 13.- Categorización de ovocitos	38

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO. 1.- CONSTRUCCION DE MANIQUI DE ALPACA	48
ANEXO. 2.- VAJINA ARTIFICIAL PARA EXTRACCION DE SEMEN DE ALPACA	48
ANEXO. 3.- MANTAS TERMICAS COLOCADAS EN LA VAGINA ARTIFICIAL	48
ANEXO. 4.- ENSAYO EN ALPACA	49
ANEXO. 5.- ADECUACIONES EN EL MANIQUI DE ALPACA	49
ANEXO. 6.- ARMADO DE MANIQUI	50
ANEXO. 7.- ADMINISTRACION DE LA HORMONA FSH (FOLLTROPIN)	50
ANEXO. 8.- PREPACION DE LOS ANIMALES PARA LA CIRUGIA	51
ANEXO. 9.- CIRUGIA INCISIÓN DE LÍNEA ALBA Y PERITONEO	51
ANEXO. 10.- IDENTIFICACIÓN DEL ÚTERO	52
ANEXO. 11.- IDENTIFICACIÓN DE ÓRGANOS	52
ANEXO. 12.- EXPLORACIÓN DEL OVARIO SUPEROVULADO	53
ANEXO. 13.- ASPIRACION FOLICULAR	53
ANEXO. 14.- SUTURA DE LOS ANIMALES	54
ANEXO. 15.- FINALIZACION DE LAPARATOMIA EXPLORATORIA DEL OVARIO	54
ANEXO. 16.- OBSERVACION DE OVOCITOS MEDIANTE ESTEREOMICROSCOPIO	54
ANEXO. 17.- ASPIRACION DE OVOCITOS VIABLES	55
ANEXO. 18.-- OVOCITOS OBSERVADOS MEDIANTE ESTEREOMICROSCOPIO	55
ANEXO. 19.- OVOCITOS NO APTOS PARA MADURACION	56
ANEXO. 20.- OVOCITOS POST 24 HORAS DE MADURACION	56
ANEXO. 21.- MICROGOTAS DE MEDIO DE MADURACION	57
ANEXO. 22.- EXTRACCION DE SEMEN DE ALPACA	57
ANEXO. 23.- MUESTRA DE SEMEN	57
ANEXO. 24.- TUBO DE CENTRIFUGA CON PERCOLL Y SEMEN DE ALPACA	58
ANEXO. 25.- CAMARA DE NEUBAHUER PARA CONTEO ESPERMATICO	58
ANEXO. 26.- ADICION DE ESPERMATOZOIDES A LA MICROGOTA CON OVOCITOS	59
ANEXO. 27.- INCUBADORA PARA PRODUCCION INVITRO DE EMBRIONES	59
ANEXO. 28.- EMBRIONES PRODUCIDOS (Categoría D)	60
ANEXO. 29.- EMBRIONES PRODUCIDOS (Categoría C)	60

RESUMEN

La producción in vitro de embriones es una biotecnología de la reproducción que en la última década ha sido muy significativa. Esta se presenta como una alternativa de gran trascendencia productiva, con la cual se puede llegar a producir crías de alto valor genético a partir de hembras que no podrían producirlos de otra manera.

En el primer capítulo de la investigación se indican los aspectos anatómicos y fisiológicos de las alpacas además de las características de la técnica de producción in vitro de embriones.

Este ensayo se realizó con el fin de determinar el Porcentaje de fertilización de los Ovocitos obtenidos, determinar la cantidad de embriones recuperados, evaluar la calidad de embriones recuperados y la evaluación de la técnica de producción in vitro de embriones desarrollada.

En lo correspondiente al Capítulo II se abordan temas relacionados con los materiales y métodos ; esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi, ubicada en el sector de Salache, Cantón Latacunga, utilizando 3 alpacas hembra mayores de 3 años súper estimuladas con FSH (Folltropin) en una dosis total de 128mg o 6,40 ml IM a las mismas que posteriormente se les realizó la cirugía de laparotomía exploratoria del ovario para aspiración de ovocitos, además se utilizó 1 macho mayor a tres años de edad del cual se extrajo el semen por medio de la utilización de una vagina artificial de alpaca.

Por último el Capítulo III consta del análisis y discusión de los resultados , las variables evaluadas no fueron muy satisfactorias ya que se obtuvo como resultado el 31 % de ovocitos categoría A el 38 % categoría B y el 31% categoría C en cuanto a la producción de embriones solamente se obtuvo 1 embrión categoría C y 2 embriones categoría D.

Huanca et al et al (2006) reporta la recuperación de 4.8 ± 0.9 embriones entre categoría A y B equivalente a una tasa de recuperación del 66,1% de embriones transferibles de alpaca.

Taylor et al 2001 Igualmente ha reportado la recuperación de 37 embriones de 47 hembras no estimuladas (79 %), de las cuales resultaron en un 41 % de preñez al ser transferidas a receptoras.

En nuestro país no se registran datos sobre este tipo de biotecnología en alpacas por lo que se recomienda continuar con investigaciones a futuro, considerando la estandarización y mejoramiento en la técnica utilizada.

ABSTRACT

In-vitro Embryo Production is a biotechnology of reproduction which in the last decade has been very significant. This is presented as an alternative of great productive importance, with which it can get to produce offspring of great genetic value from females who could not afford them in other ways.

The first chapter of the research indicates the anatomical and physiological aspects of alpacas as well as the characteristics of the technique of In-vitro Embryo Production.

This trial was performed in order to determine the percentage of fertilization of the oocytes obtained, determine the amount of recovered embryos, and evaluate the quality of embryos recovered and the evaluation of the technique In-vitro Embryo Production that was developed.

In what corresponds to chapter 2 we talked about topics related to materials and methods, this research was carried out in the Biotechnology Laboratory of Reproduction in the Technical University of Cotopaxi located in Salache – Latacunga. So, we used 3 female alpacas older than 3 years which were super stimulated with FSH in a total dose 6.40 ml IM. Subsequently, they were conducted to a surgery of the ovarian exploratory laparotomy for the aspiration of oocytes. Besides, we used 1 more male older than 3 years from which were extracted the semen through the use of an artificial vagina of alpaca.

Finally, chapter 3 is about the analysis and discussion of the results. The evaluated variables were not very satisfactory because we obtained a result of 31% of oocytes category “A”; 38% category “B” and 31% category “C”. In terms of the production of embryos we only got 1 embryo category “C” and 2 embryos category “D”.

Huanca et al (2006) reported the recovery of 4.8 ± 0.9 embryos between category A and B equivalent to a recovery rate of 66.1% alpaca transferable embryos.

Taylor et al 2001 also reported the recovery of 37 embryos unstimulated 47 females (79%), which resulted in 41% of pregnancy to be transferred into recipient.

In conclusion we obtained a low percentage of oocytes suitable for fertilization as well as a low percentage of In-vitro Embryo Production due to different factors such as sperm death, lack of sperm penetration, degeneration of oocytes and deficiencies in the handling of the equipment that was used.

In Ecuador is not registered data on this type of biotechnology about ALPACAS so that it is recommended to continue with this investigation taking into consideration the improvements that must be applied in this technique.



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
CENTRO CULTURAL DE IDIOMAS



AVAL DE TRADUCCIÓN

En calidad de Docente del Centro Cultural de Idiomas de la Universidad Técnica De Cotopaxi, yo Lcda. Marcia Janeth Chiluisa Chiluisa con la C.C. 050221430-7 CERTIFICO que he realizado la respectiva revisión de la Traducción del Abstract; con el tema: “EVALUACION DE LA PRODUCCION INVITRO DE EMBRIONES DE ALPACAS (Vicugna Pacos) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCION DE LA UNIVERIDAD TECNICA DE COTOPAXI.”

cuyos autores son: Sarzosa troya Mario Santiago

Culcay Troncoso Hernan Israel

Director de tesis : Dr. Edwin Pino

Latacunga, Febrero del 2014

Docente:

Lcda. Marcia Janeth Chiluisa Chiluisa

C.I. 050221430-7

INTRODUCCIÓN

La producción in vitro de Embriones es una biotecnología de la reproducción que ha experimentado un gran adelanto en las últimas décadas y ha dotado a la ciencia de nuevas herramientas capaces de manipular y modificar el genoma de los seres vivos más evolucionados; los mamíferos.

Es importante señalar que el desarrollo de embriones cultivados in vitro, ha presentado una serie de dificultades, particularmente en aquellos producidos después de la maduración y fertilización de ovocitos in vitro.

En nuestro país no existen reportes de fertilización invitro de embriones de alpaca de allí surge la necesidad de estandarizar sistemas de maduración de ovocitos, capacitación espermática, fertilización y cultivo in vitro de embriones de esta especie.

El proceso de producción in vitro de embriones en alpacas puede dividirse en tres pasos fundamentales, los cuales, independientemente del protocolo utilizado, en orden cronológico son: obtención de ovocitos, maduración o capacitación de ovocitos, fecundación de ovocitos maduros, cultivo de embriones.

Estos pasos comprenden una compleja serie de procesos fisiológicos los cuales condicionan el éxito o el fracaso de esta biotecnología.

OBJETIVOS

GENERAL

- Evaluar la Producción Invitro de Embriones en Alpacas realizada en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

ESPECÍFICOS

- Determinar el porcentaje de fertilización de los ovocitos obtenidos.
- Determinar la cantidad de embriones producidos.
- Evaluar la calidad de embriones producidos.
- Evaluar el protocolo de producción in vitro de embriones de Alpaca utilizado.

CAPITULO I

1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1.1 Generalidades de la Alpaca

La alpaca (*Vicugna pacos*) es una especie doméstica de mamífero artiodáctilo de la familia Camelidae, derivada de la vicuña salvaje su domesticación se viene realizando desde hace miles de años, las relaciones entre la alpaca y los demás camélidos sudamericanos han sido controvertidas durante muchos años. (e)

En los siglos XVIII y XIX, cuando recibieron nombres científicos, se creía que la alpaca era descendiente de la llama (*Lama glama*), y fue denominada por ello *Lama pacos*, ignorándose sus similitudes con la vicuña, tanto en tamaño, como en la lana y la dentición.

Su clasificación se complicó tras comprobarse que las cuatro especies de camélidos sudamericanos pueden cruzarse entre sí y dar descendencia fértil. No fue hasta el siglo XXI que, gracias al desarrollo de las técnicas de análisis de ADN pudo demostrarse finalmente que la alpaca y la vicuña están estrechamente relacionadas, y que el nombre científico correcto es *Vicugna pacos*. (f)

1.1.1 Características de la Alpaca

Las alpacas pesan entre 60 y 70 kilogramos y su altura a la cruz es de 1 metro es más pequeño que la llama. Han sido seleccionadas para la producción de fibras, cuyo diámetro varía de 12 a 28 micrómetros, las cuales son muy utilizadas aún en estos días. Son animales típicos del Ecuador, Bolivia, Perú y Chile. (g)

El hábitat predominante está arriba de los 3.500 metros sobre el nivel del mar, puede vivir hasta los veinte años. La hembra puede preñarse por celo inducido, pudiendo tener crías durante todo el año, aunque normalmente pare en los meses

lluviosos de diciembre a febrero. La gestación dura 11,5 meses y las pariciones nunca dan mellizos. **(a)**

Hay dos fenotipos reconocidos, denominadas Huacaya y Suri: La variedad Huacaya es la más abundante y se caracteriza por la cobertura total del cuerpo con fibras muy densas que además cubren piernas, frente y mejillas, llegando a formar un copete que puede cubrir los ojos. La fibra es rizada, dándole una apariencia esponjosa.

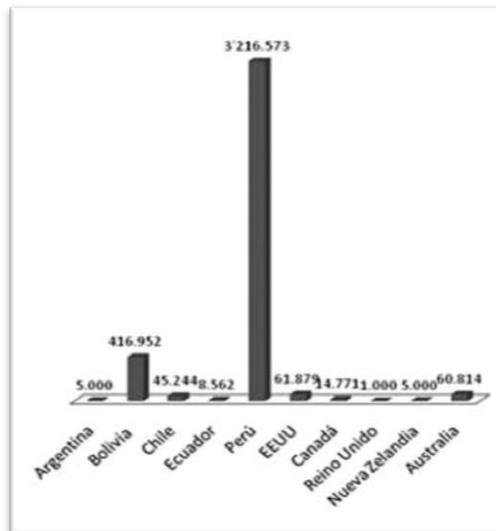
La variedad Suri presenta una cobertura de fibras de aspecto más sedoso, lacio y de mayor crecimiento en largo y, debido a su estructura, cae desde la línea media a ambos lados del cuerpo. Si bien desde el punto de vista trófico es un herbívoro selectivo y oportunista, en este caso manifiesta preferencia por las herbáceas y solamente ramonea cuando hay extrema necesidad; además, debe beber agua todos los días. **(6)**

GRÁFICO. 1.- Área de distribución de Camélidos



Fuente: Sitio Argentino de Producción Animal - CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS **(4)**

GRÁFICO. 2.- Población de alpacas a nivel mundial



Fuente: VILCA, J. 2008. Presentación Camélidos y Población San Pablo. Riobamba-Ecuador (16)

1.1.2 Alpacas en el Ecuador

Los productores de alpacas en el Ecuador se encuentran en proceso de crecimiento, cambio e innovación, y en una encrucijada en búsqueda de alternativas y mejorías en cuanto al manejo, procesamiento y comercialización de los productos en base a la alpaca han existido diversas razones para la introducción de alpacas en el Ecuador; la principal de ellas han sido las consideraciones ambientales. (j)

Efectivamente, estos animales poseen características favorables en este sentido, tales como las almohadillas plantares en sus extremidades y el peso ligero en relación a los bovinos y equinos, lo que significa que en condiciones aceptables de capacidad de carga, no erosionan el suelo y además, contribuyen a la conservación de los humedales. (14)

Según un censo actualizado al 2010, elaborado por el consultor Wilson Pintado, se logró determinar que en Ecuador existen más de 8.561 alpacas, de las cuales 4.163, un 48.62%, pertenecen a la provincia de Cotopaxi. Los datos de este

estudio son estimados, puesto que no se basan en información directa a nivel de productor. **(16)**

Con el fin de mejorar la calidad genética de los hatos alpaqueros el Ministerio de Agricultura, Ganadería, a través de la Subsecretaría de Fomento Ganadero, importó 200 alpacas desde la ciudad de Puno, Perú. Sin mayores contratiempos, las alpacas llegaron al Cantón Salcedo, Provincia de Cotopaxi, donde fueron entregadas gratuitamente a pequeños agricultores para la repoblación y mejoramiento genético. **(j)**

1.2 ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA EN ALPACAS

1.2.1 Aparato reproductor en las hembras

1.2.1.1 Vulva

Externamente, el órgano femenino visible es la vulva. Es una apertura orientada verticalmente, de 2,5 a 3,0 cm de longitud. Tiene labios externos bien definidos, que en la parte inferior terminan con una protuberancia.

No se observan cambios marcados en el aspecto de la vulva en relación a los ciclos foliculares. Se le puede notar tumefacta y algo hinchada en hembras muy próximas al parto. **(4)**

1.2.1.2 Vagina

Normalmente la vagina de las Alpacas es de 12 a 18 cm de largo y 2 a 4 cm de diámetro. Esta se dilata para permitir la salida de la cría, pero los partos difíciles a menudo provocan lesiones en la vagina. **(2)**

1.2.1.3 Cérvix

El cérvix puede describirse como una espiral apretada (con dos o tres vueltas) de tejido muscular. El canal cervical (que conecta la vagina con el útero) es sinuoso y de unos 2 a 4 cm de longitud. En hembras no preñadas y receptivas al macho, el cérvix se presenta penetrable, permitiendo así la intromisión del pene para la deposición de semen en el útero. En contraste, el cérvix se cierra una vez que ocurre la concepción, y permanece cerrado durante toda la preñez. **(a)**

1.2.1.4 Útero

Será el órgano que aloje al feto durante los 11 meses de gestación. Tiene forma de Y en alpacas y está constituido por dos oviductos, cuerpo del útero y cérvix **(15)**

En hembras no preñadas el cuerpo del útero es de aproximadamente 2 a 4 cm de largo, mientras que los cuernos son de unos 8 a 15 cm. El cuerno izquierdo (donde se desarrollan la casi totalidad de las preñeces) es de mayor tamaño que el derecho. Durante la cópula el macho deposita el semen en el útero y los espermatozoides migran de allí hasta el lugar de fertilización (oviductos). **(i)**

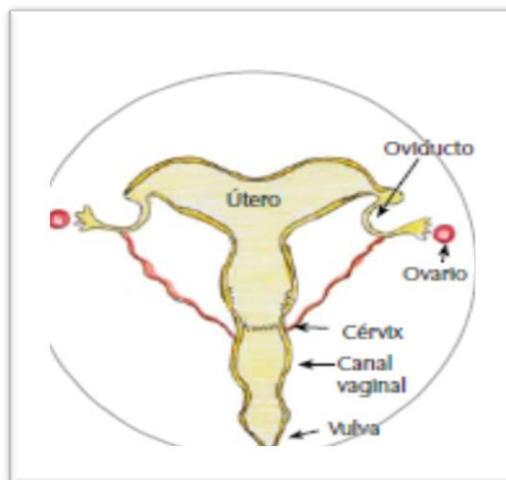
1.2.1.5 Oviductos

Los oviductos son unos tubos delgados de alrededor de 20 cm de longitud. Por ellos desciende el óvulo para encontrarse con el espermatozoide y permitir la fecundación. **(7)**

1.2.1.6 Ovarios

Localizados en la cavidad abdominal. Están fijados al mesovario y envueltos por la bolsa ovárica. En hembras pre-púberes, la superficie ovárica es lisa, en cambio en hembras en estado reproductivo es irregular debido a la presencia de folículos en varios estadios de desarrollo. En la Alpaca, el ovario mide en promedio 15mm de largo, 12mm de ancho y 09 mm de espesor el ovario izquierdo pesa 2,4 – 1,3g y el derecho 1,9- 1.0g. **(2)**

GRÁFICO. 3.- Anatomía del aparato reproductor de la hembra



Fuente: SEPULVEDA, Manual para el manejo de camélidos sudamericanos. (15)

1.2.1.8 Edad y peso a la pubertad

El inicio de la pubertad en alpacas está condicionado por el nivel nutricional en que se crían los animales. Es así que la edad de la pubertad varía entre 5 meses y 3 años de edad. La pubertad ocurre cuando la hembra llega aproximadamente a un 60 % de su peso adulto. (8)

1.2.1.9 Ciclo sexual

En los mamíferos de ovulación inducida o refleja, la ovulación ocurre como respuesta a la copula, es decir, que la ovulación en la alpaca es provocada. Los factores que estimulan las descargas de hormonas hipofisarias responsables de la ovulación parecen ser naturales nerviosas y algunas veces emocionales. En ausencia del macho la hembra presenta ondas foliculares de una duración aproximada de diez a doce días, es decir crecimiento de los folículos de Graff, maduración y regresión o atresia de los folículos.

Las alpacas muestran largos periodos de receptividad sexual o celo (hasta 36 días) con un periodo de anestro no mayores de dos días. Esta peculiar conducta de periodos largos de celo o muy cortos de anestro refleja las ondas de crecimiento, maduración y atresia de folículos en el ovario. (7)

1.2.1.10 Ovulación

La ovulación es inducida por el acto de la cópula. Pero también puede ser inducida artificialmente mediante la administración de Hormonas como la hcg o la GnRh

A medida que los folículos se desarrollan la hembra se torna sexualmente receptiva. Aunque continuamente hay muchos folículos pequeños en el ovario, generalmente solo uno (en uno de los ovarios) madura y permanece en ese estado por unos 10 a 12 días. Si durante ese período ocurre la cópula, la hembra ovula, puede haber hembras que ovulen en respuesta a la presencia del macho (sensaciones visuales, olfativas y auditivas) sin que ocurra la monta. **(15)**

A pesar de que las hembras aceptan al macho y copulan independientemente del tamaño del folículo, la respuesta ovulatoria post copula solamente ocurre en aquellas con folículos mayores a 6 mm de diámetro.

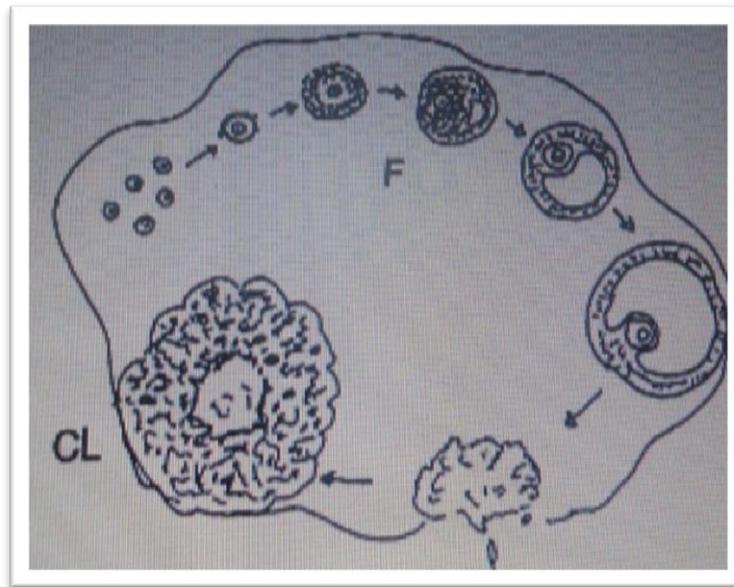
Después de la copula las hembras que fallan inicialmente en ovular continúan en celo hasta recibir el estímulo capaz de inducir la ovulación. Por otro lado las hembras que llegan a ovular siguen en celo mientras transcurre el tiempo necesario para que el cuerpo lúteo inicie su actividad secretoria. **(11)**

Si no se produce la cópula el folículo involuciona, pero normalmente otro folículo ya está madurando (frecuentemente en el ovario opuesto), de modo que hay 'ondas' de desarrollo folicular que se superponen, resultando en periodos casi continuos de receptividad sexual de hasta 36 días. **(6)**

La ovulación tiene lugar entre uno y dos días después de la copula. Después de la ovulación se forma el cuerpo lúteo, que segrega la hormona progesterona, responsable de suprimir la actividad sexual. El cuerpo lúteo alcanza su máxima actividad funcional 8 a 9 días después de la copula. Si se registra la concepción el cuerpo lúteo mantiene su tamaño y actividad hormonal durante toda la gestación.

Si no ocurre la concepción, a partir del octavo día después de la copula, el cuerpo lúteo involucrena rápidamente y la hembra ya puede estar receptiva nuevamente 12 días después de la cópula que provocó la ovulación. Los períodos de no receptividad en hembras no preñadas corresponderían con la máxima actividad del cuerpo lúteo (8 a 9 días después de la cópula). (g)

GRÁFICO. 4.- Diagrama de las estructuras del ovario (Folículo madurando (f), óvulo (ov), cuerpo lúteo (cl)).



Fuente: FAO 1996 Manual de prácticas de manejo de Alpacas y Llamas, Roma 1996, ISBN 92-5-303903-5: pág. 9-14, 30 – 34, 42- 47 (g)

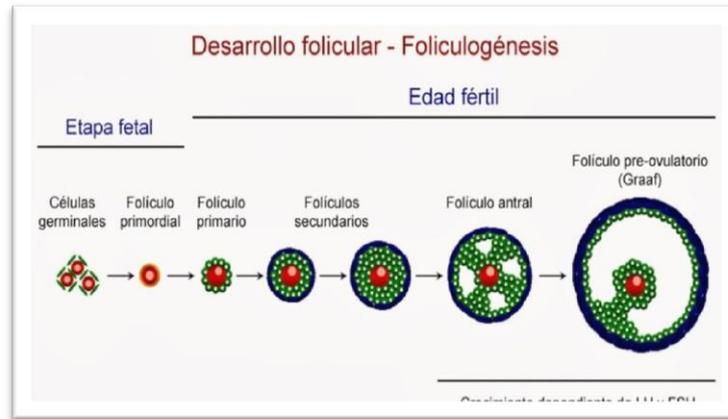
1.2.1.11 Foliculogénesis

El folículo constituye la unidad estructural y funcional de los ovarios. Se clasifican en primordiales, primarios, secundarios y terciarios de acuerdo a las características histológicas de las células de la granulosa que rodean al ovocito y al grado de maduración del mismo.

La foliculogénesis es un proceso bastante conservado entre los mamíferos existen características diferentes según las especies. Los camélidos sudamericanos se caracterizan por ser una especie de ovulación inducida. Es decir que la LH no aumenta en cada ciclo sino que solamente se produce el pico necesario para

desencadenar la ovulación bajo un estímulo natural producido por la monta o artificialmente por la administración de hormonas (hCG y GnRH). (o)

GRÁFICO. 5.- Desarrollo folicular

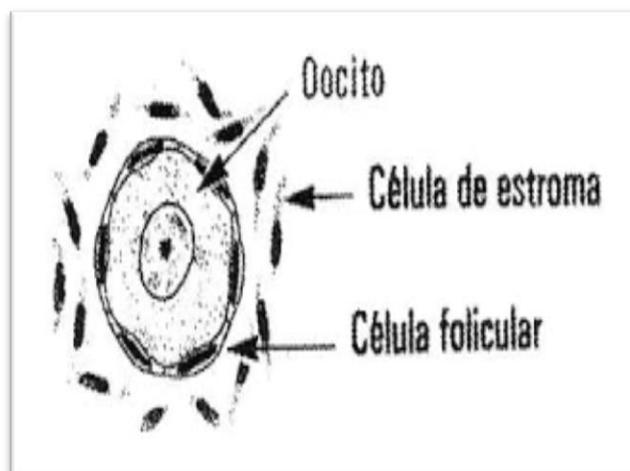


Fuente: Ropero A. Esquema del desarrollo Folicular o foliculogénesis. (s)

1.2.1.12 Folículos primordiales:

Ovocito con 1 capa de células foliculares planas. El ovocito es esférico, bastante grande, con un oolema (membrana) liso, núcleo central y nucléolo denso. Tiene gránulos corticales en la periferia. Además hay una sola sección de Golgi (reducido), y gran cantidad de mitocondrias concentradas cerca del núcleo. (o)

GRÁFICO. 6.- Folículo primordial



Fuente: Scielo.com Consideraciones sobre la dinámica ovárica en Camélidos sudamericanos (o)

1.2.1.13 Folículo primario unilaminar:

Ovocito con una capa de células foliculares cúbicas. Está limitado por una membrana basal muy gruesa (membrana granulosa). Las células foliculares cúbicas pasan a llamarse células de la granulosa. Aumenta algo el diámetro general. En el oolema se crean micro vellosidades.

Se genera un espacio entre el ovocito y las células de la granulosa donde se comienzan a acumular glicoproteínas. Esa zona se llama zona pelúcida y será responsable del reconocimiento del espermatozoide en la fecundación. (o)

GRÁFICO. 7.- Folículo primario unilaminar

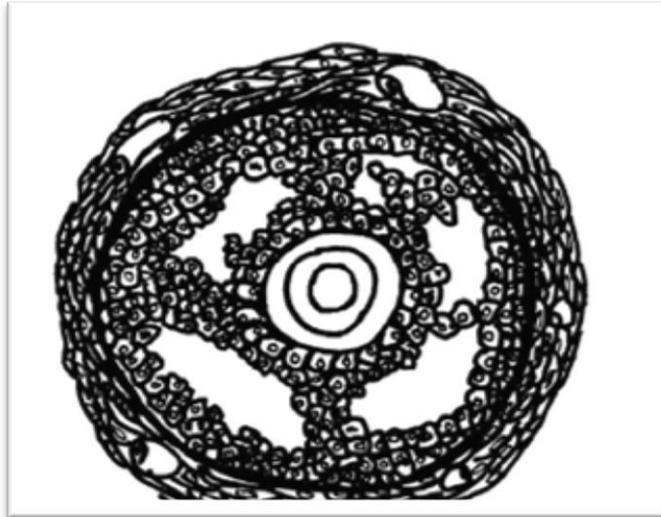


Fuente: Scielo.com. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en camélidos sudamericanos (o)

1.2.1.14 Folículos secundarios:

Ovocito está agrandado, con células foliculares cúbicas y con varias capas, de una a cinco, con cavidad antral. A medida que el antro crece, el ovocito va desplazándose Hacia un extremo del folículo. En este estadio el desarrollo folicular aún es mayoritariamente independiente de las hormonas LH y FSH.

GRÁFICO. 8.- Folículo secundario

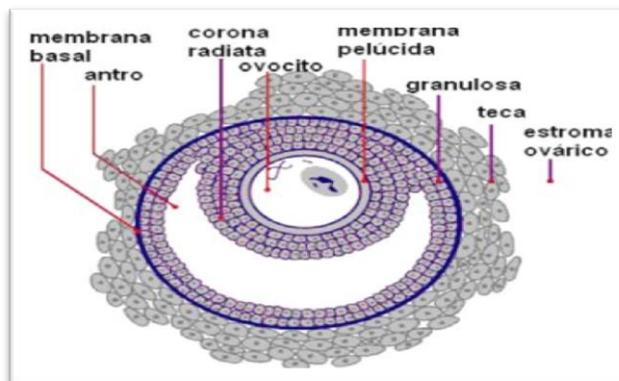


Fuente: Scribd.com Sistema reproductor en mamíferos (p)

1.2.1.15 Folículo terciario, maduro o de Graaf:

Ovocito con células adyacentes forman el cúmulo ovífero. El folículo está ya maduro y listo para que el folículo “estalle” y que el líquido astral arrastre el cúmulo ovífero. Responden al estímulo de la LH produciendo cambios morfológicos y bioquímicos que finalizarán reiniciando la meiosis y desencadenando la ovulación. En Camélidos el folículo pre ovulatorio es mayor a 10 a 18 mm. (p)

GRÁFICO. 9.- Esquema del folículo de graff



Fuente: Scielo versión On-line ISSN 1668-3498. Buenos aires 2006. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en camélidos sudamericanos (s)

1.2.2 Órganos Reproductivos Masculinos

1.2.2.1 Escroto y testículos

Los testículos tienen una forma ovalada, y en un macho adulto miden alrededor de 4 a 6 cm de largo y unos 2,5 a 3,5 cm de ancho. Al año de edad el largo es de 1,0 a 1,5 cm. Los testículos cumplen un papel fundamental, siendo responsables de la producción de esperma. (4)

Esperma es el líquido que contiene millones de espermatozoides que son los encargados de fertilizar el óvulo de la hembra. Están ubicados bajo el ano y a cada uno lo cubre una estructura pendulosa llamada escroto (bolsa escrotal).

Al nacimiento muchos animales tienen testículos que aún no han descendido a la bolsa escrotal, esto es normal, sin embargo a los seis meses de edad ya deberían estar en su ubicación correcta (bolsa escrotal), de lo contrario no se deben seleccionar como reproductores. (5)

1.2.2.2 Epidídimo y conducto deferente

Actúa como depósito y lugar de maduración del esperma. Durante la eyaculación el esperma pasa del epidídimo al conducto deferente. De allí pasará a la uretra y finalmente al exterior.

1.2.2.3 Glándulas Accesorias

Las glándulas accesorias (próstata y bulbo-uretrales) están localizadas en la pelvis y por encima del resto del tracto genital masculino. Estas glándulas segregan fluidos que dan volumen, nutrientes y estabilidad al semen. (2)

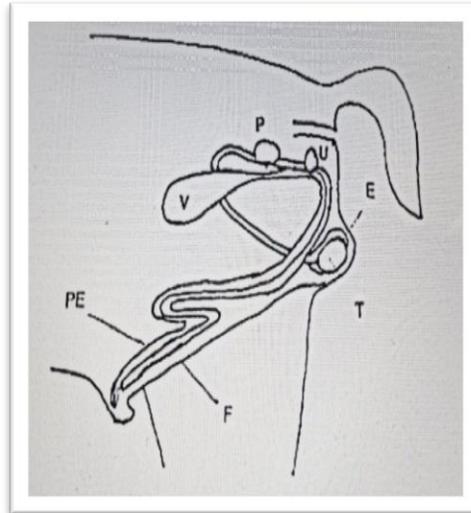
1.2.2.4 Pene y prepucio

La flexión peniana se endereza y el pene sale del prepucio unos 15 a 25 cm. La punta del pene tiene una proyección cartilaginosa firme, en forma de gancho curvado hacia la derecha. Esta proyección sobrepasa la abertura de la uretra, y

asiste en la penetración del cérvix de la hembra durante la cópula. (6)

GRÁFICO. 10.- Anatomía del Aparato Reproductor del Macho.

Vejiga (V), Próstata (P), Glándula Bulbo-Uretral (U), Epidídimo (E), Testículo (T), Forro (F), Pene (PE).



Fuente: FAO 1996 Manual de prácticas de manejo de Alpacas y Llamas, Roma 1996, ISBN 92-5-303903-5 (4)

1.3 Pubertad y edad al primer empadre

Los machos producen semen fértil alrededor de un año. Sin embargo, a esa edad las adherencias naturales del pene con el prepucio (forro) impiden a más del 90% de los machos copular normalmente. A los dos años alrededor del 70% de los machos ya lo tiene libre, mientras que alrededor del 100% lo tiene libre a los tres años. (6)

1.4 Espermatogénesis y características seminales

El semen de la alpaca es altamente viscoso, lo que hace difícil su manipulación en el laboratorio, También es de notar que debido a la alta viscosidad del plasma seminal, no existe lo que se aprecia en el semen ovino por ejemplo; la motilidad nasal y la motilidad individual es ciertamente muy lenta.

La eyaculación es un proceso continuo con más o menos una calidad de semen uniforme desde el inicio a la terminación de la copula, y no existe fracciones como se observa en otras especies domésticas. (7)

La colección de semen en esta especie es complicada por la posición de copula q adopta tanto el macho como la hembra, además del tiempo largo del proceso de eyaculación, sin mucho éxito.

1.5 Método de colección de semen en alpacas

1.5.1 Vagina artificial.

Mediante un maniquí en forma de una hembra sentada en posición de cópula; la vagina artificial será una modificación de la vagina artificial usada para vacunos y ovinos, la cual consiste en un tubo rígido de 7 cm de diámetro por 25 cm. de largo con una funda interna de látex, un cono de látex al que se envuelve un alambre en espiral simulando la cérvix de la alpaca y al final un frasco de colección de semen de ovino o un tubo de centrifuga, el agua a 45° se coloca por una válvula. **(j)**

Los machos aceptan el maniquí después de un corto entrenamiento; la copula se interrumpe cada 10 minutos aproximadamente para renovar el agua caliente, el semen colectado varia, dependiendo del macho,

El color del eyaculado, independientemente del volumen, de un blanco lechoso a blanco claro, este semen no muestra motilidad nasal por lo espeso de su consistencia.

La utilización de vagina artificial en combinación con una hembra receptiva es la técnica más óptima de obtener semen de buena calidad, el que se puede utilizar para fines de inseminación artificial, teniendo en cuenta de usar una fuente de calor continuo y la característica que imite a la del cérvix. **(i)**

TABLA. 1.- Tiempo de cópula y características del semen de alpaca colectado con vagina artificial con el apoyo de un maniquí o de hembras receptoras.

	Con maniquí	Con hembra receptiva
Tiempo de cópula (min)	15.9 ± 0.6 ^a	16.8 ± 0.7 ^a
Volumen (ml)	1.03 ± 0.03 ^a	1.73 ± 0.09 ^b
Motilidad (%)	34.2 ± 5.3 ^a	68.9 ± 4.9 ^b
Concentración (x 10 ⁴ /ml)	32.8 ± 4.3 ^a	57.5 ± 8.3 ^b
Espermatozoides vivos (%)	34.3 ± 4.2 ^a	72.1 ± 1.9 ^b
Espermatozoides anorm (%)	14.9 ± 1.1 ^a	13.9 ± 0.7 ^a

A,b Letras diferentes entre columnas indican valores estadísticamente diferentes (p<0.05).

Fuente: Scielo Chile. Scientific Electronic Library (ñ)

2. PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES

Los resultados de producción in vitro de embriones en distintas especies. Han mejorado significativamente a medida que avanzan los conocimientos acerca de sus requerimientos. (r)

En Camélidos la primera especie con la que se trabajó en MIV y FIV fue la llama (Del Campo et al 1992, Del Campo et al 1994, Ratto et al 1999, Ratto et al 2005, Conde et al 2006, Conde et al 2008). Estableciéndose como 28 horas el tiempo óptimo de maduración in vitro.

En alpacas Gómez al (2002) y Ratto et (2007) reportaron por primera vez la maduración de los complejos cumulus ovocito recuperados por laparotomía ventral utilizando 26 horas para la MIV. Obtuvieron 46% y 40% (Gómez), de ovocitos en metafase II en Alpacas donantes súper ovuladas con FSH Y Ecg respectivamente. (Ratto et al 2007) mejoraron los resultados obtenidos por Gómez alcanzando 82% y 64 % de ovocitos en metafase II con los mismos tratamientos súper ovulatorios. (9)

Por otro lado Ruiz y Correa 2007 maduraron los complejos cúmulus ovocito de Alpaca durante 27 horas y obtuvieron 75% de ovocitos maduros por lo tanto existen reportes que indican el uso de 22 – 25 horas de tiempo de maduración (Ruiz et al 2007, Mendoza et al 2008, Sacha et al 2009, Taipei et al 2010, Ruiz et al 2011, Huaman et al 2011) de complejos cúmulus ovocito de Alpacas en buenas tasas de segmentación y de desarrollo hasta blastocisto.

Sin embargo Huanca et al 2009 recomienda 38 horas más para la MIV de complejos cúmulus ovocito de Alpaca debido a que encontraron 18.9 %, 42.9%, y 65.8% de complejos cúmulus ovocito en metafase II para 30, 34, Y 38 horas de maduración respectivamente y tasas de segmentación de 9.5 %, 7.7% y 15.4% para 30, 34 y 38 horas de maduración respectivamente no reporta el logro de blastocistos (12)

En consecuencia se trata de una tecnología muy reciente en la cual se producen avances año a año con las consecuentes mejoras de la misma. La fecundación in vitro es de gran apoyo en el desarrollo de técnicas que tienen un potencial importante en la reproducción animal, tales como la micro manipulación de embriones.

El desarrollo de esta biotecnología permite la producción de los mismos hasta estadios avanzados compatibles con la transferencia a hembras receptoras. (ñ)

2.1 Características de la Técnica

La producción in vitro de embriones comprende diferentes etapas:

- ✓ Obtención y maduración de las gametas femeninas (óvulos u ovocitos).
- ✓ Fecundación in vitro de los ovocitos madurados
- ✓ Cultivo in vitro de los embriones.

Los ovocitos son recuperados a partir de los ovarios de las hembras destinadas a tal fin de diferentes maneras:

- ✓ A partir de ovarios de mataderos.
- ✓ A partir de alpacas vivas. **(b)**

3. SÚPER ESTIMULACIÓN OVÁRICA EN ALPACAS

3.1 Inhibición de la onda folicular.

Según Bourke et al. (1995) al implementar súper estimulación ovárica es necesario comenzar el tratamiento hormonal en ausencia de folículos dominantes. Miragaya et al. (2006) observaron que iniciar el tratamiento en presencia de un folículo mayor a 5 mm induce el crecimiento de ese único folículo.

Para lograr inhibir la dinámica ovárica, se han desarrollado varios protocolos basados en el efecto negativo de la progesterona sobre la actividad folicular (Aba et al., 1995). Se puede utilizar una fase luteal natural (induciendo la ovulación) o reproduciendo la fase luteal artificialmente utilizando progesterona o progestágenos exógenos. **(r)**

3.2 Hormonas utilizadas en camélidos para inducir súper-estimulación ovárica

Los tratamientos con 1000 y 1500 UI de hormona gonadotrofina coriónica equina son efectivos en inducir crecimiento folicular múltiple, pero con la aplicación de 1500 UI es mayor la producción de folículos. **(5)**

Además, la súper-estimulación con hormona gonadotrofina coriónica equina está asociada a una mayor proporción de complejos ovocito cumulus expandidos y COC's en MII, comparado con el tratamiento con FSH.

Los camélidos son ovuladores inducidos, por lo tanto, la maduración in vivo de ovocitos dentro del folículo puede producirse mediante la inducción de la liberación de LH administrando análogos de GnRH, como la buserelina o hCG.

La administración de buserelina es beneficiosa para la recuperación de una gran

cantidad de complejos ovocito cùmulus expandidos, los cuales pueden ser utilizados directamente en técnicas de reproducción asistida sin necesitar de la previa maduración in vitro. **(8)**

Tal como en otras especies, en alpacas se han estudiado diversos protocolos para inducir el desarrollo folicular mediante el uso de FSH y PMSG. Ratto et al. (1997) reporta una respuesta similar en el número de folículos = 6 mm entre alpacas tratadas con FSH y eCG.

En lo que respecta a FSH, se ha reportado el uso de múltiples dosis (6 a 10) cada 12 horas (en 3 a 5 días de tratamiento) con una dosis total de 50 a 200mg, pero sin resultados promisorios (Gamarra et al., 2007) **(j)**

3.3 Aspiración folicular mediante laparotomía

Conjunto de maniobras quirúrgicas que se realizan a los efectos de crear una vía de acceso a los órganos contenidos en la cavidad abdominal.

A continuación se detallan las maniobras quirúrgicas necesarias para la realización de una laparotomía:

- a) Incisión de la piel con bisturí sobre la línea sagital
- b) Divulsión del tejido subcutáneo
- c) Incisión de línea alba y peritoneo **(m)**

Una vez localizado los ovarios se punzan los folículos maduros que contienen las gametas femeninas (ovocitos)

El líquido aspirado se vierte en una placa de petri **(f)**

De inmediato se procede a su identificación y valoración en el laboratorio de FIV.. Es indispensable una revisión pre anestésica completa en la que, según cada caso, se decidirá el tipo anestésico más adecuado (generalmente una sedación).

Se observa y valora cada uno de los ovocitos y las células foliculares que lo

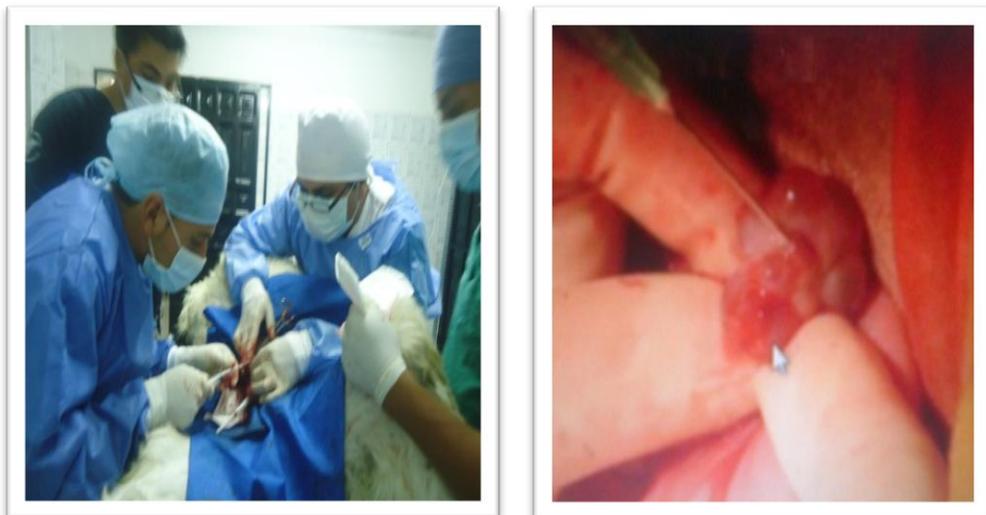
rodean clasificándolos según su estado de maduración. Posteriormente los distribuye en placas de cultivo apropiadas que serán mantenidas a 37° de temperatura y condiciones de humedad y gasificación apropiadas hasta el momento de la Fertilización.

Si alguno de los ovocitos obtenidos no presenta el grado de madurez suficiente, el tiempo de cultivo será mayor y la inseminación se realizará después de las 6 horas de su recuperación o al día siguiente si se considera oportuno. (s)

Existen ovocitos muy inmaduros o degenerados que no cumplen las condiciones para ser inseminados por lo que se descartan. La obtención de gametas provenientes de animales vivos ofrece la posibilidad de producir embriones de animales genéticamente superiores.

La técnica con mayor porcentaje de recuperación de ovocitos es la aspiración de folículos vía laparotomía (r)

GRÁFICO. 11.- Aspiración folicular vía laparotomía luego del tratamiento de súper estimulación



Fuente: Directa
Elaborado por: Culcay. I, Sarzosa S.

TABLA. 2.- Categorización de ovocitos

Categoría A	Cúmulus con capas múltiples, compacto pero traslucido. Citoplasma con granulación fina, densa y uniforme.
Categoría B	Cúmulus ligeramente expandidos, con menor número de capas que pueden cubrir la mitad de la zona pelúcida, granulaciones ligeramente más gruesas.
Categoría C	- Cúmulus parcialmente expandido y disperso. - Red de uniones son presencia de células de cúmulus. - Ovocitos pequeños o grandes, ovocitos desnudos. - Cúmulus muy oscuros(marrón oscuro, negro) - Citoplasma de color muy claro o negro. Citoplasma bueno con áreas muy claras o muy oscuras.

Fuente: RIVAS R. 2012. Manual de prácticas de Biología de la Reproducción (13)

4. PREPARACIÓN DEL SEMEN QUE SE UTILIZA EN PIV DE EMBRIONES.

Requiere de la aplicación de técnicas con las cuales se recupere un alto porcentaje de espermatozoides móviles con morfología normal, libre de detritus y espermatozoides muertos.

Para obtener embriones se han utilizado espermatozoides de epidídimo o de eyaculado. El uso de espermatozoides del epidídimo tiene la ventaja de que estas células tienen movilidad progresiva y que el manejo de la muestra es más fácil porque no tiene plasma seminal.

La principal desventaja es que no se utiliza espermatozoides de machos genéticamente superiores. Utilizando espermatozoides eyaculados se pueden

utilizar machos elegidos pero, por otro lado, la mayoría de los espermatozoides no se presentan movilidad progresiva y el manejo de las muestras es difícil debido a la viscosidad y a la filancia del plasma seminal. (2)

Para poder utilizar las técnicas de ICSI y FIV con semen de machos de alto valor genético, es necesario utilizar un buen método de recolección de semen y aplicar protocolos que permitan la separación y selección de espermatozoides móviles del plasma seminal. En camélidos se han producido embriones por FIV e ICSI utilizando eyaculados incubados en una solución de 1 mg/ml de colagenasa en medio H TALP BSA. (j)

4.1 Capacitación espermática

Para realizar una fertilización in vitro es esencial tener disponible una forma de preparación espermática. Se han utilizado numerosos sistemas de capacitación, incluyendo medios con alto poder iónico y glucosaminoglicanos como la heparina y el sulfato de fucosa, envejecimiento, cambio de pH, ionóforos de calcio y cafeína y fluido del oviducto (First y Parrish, 1987, 1988; Parrish et al., 1989). (5) En general, cualquier agente que cause entrada de Ca^{++} dentro del acrosoma del espermatozoide, y cause un incremento en el pH, causará capacitación espermática (First y Parrish, 1988). Uno de los métodos más efectivos es el que utiliza glucosaminoglicanos (heparina) para la capacitación espermática. Entre los métodos más comúnmente utilizados están:

El método de percol, el método “swim-up” y el método de filtración “glass-wool”. Estos métodos son utilizados en la capacitación espermática y purificación del semen. El método del percol es uno de los más utilizados, obteniendo con él buenos resultados (Rivera et al., 2000); el método “swim-up” del semen es un procedimiento más lento (requiere 1 hora aproximadamente para su realización) y no ha dado mejores resultados que el procedimiento que se realiza con percol (Monterosso et al., 1994; Brocas et al., 1997); el método de filtración “Glass-wool” es otra alternativa para la purificación espermática, que tiene la ventaja que provee semen con una viabilidad cercana al 100%. Los lavados por

sedimentación y resuspensión a través de la centrifuga ayudan a separar los materiales indeseables de una forma rápida y efectiva, además aumentan la motilidad espermática. (10)

4.2 Cultivo in vitro de embriones

Actualmente la producción de embriones in vitro se interesa en 2 aspectos básicos con son el desarrollo de medios de cultivo que respondan a las necesidades metabólicas de los embriones durante su desarrollo y la segunda que eviten en su composición células somáticas. (Carlomagno & Novoa, 2000).

Para lograr esto es necesario conocer los requerimientos bioquímicos de los embriones durante su desarrollo hasta el estadio de blastocistos tanto in vivo como in vitro. Se han estudiado las características bioquímicas del medio, las cuales variaron con el tiempo de cultivo, indicando la existencia de una compleja interacción entre el metabolismo embrionario y los sustratos del medio (Palma, 2001).

El medio más usado y exitosamente empleado en la maduración de ovocitos es el Tissue Culture Medium 199 (TCM 199), Compuesto por sales Earle's con 4-(2-Hidroxietil)- 1-piperazinaetansulfónico (HEPES) y bicarbonato como estabilizadores de pH y suplementado con piruvato, lactato, vitaminas, aminoácidos, purinas, proteínas (albumina bovina o suero). Los ovocitos como los embriones y la mayoría de las líneas celulares se desarrollan a un pH de 7,4. (Hafez, 2004).

5. FERTILIZACIÓN IN VITRO

Es la culminación de una serie de eventos previos que involucran complejos mecanismos de reconocimiento celular e interacción gamética. Las evidencias sugieren que esta interacción se establece a través de un sistema de receptores complementarios que serían claves en el reconocimiento como también en la unión de los gametos (Jedliki y Barros, 1985).

La fertilización Consiste en la interacción entre los componentes del ovocito y los del espermatozoide, activándose la segunda división meiótica del ovocito y la restauración del número cromosómico del futuro individuo. La descondensación de la cabeza del espermatozoide ocurre dentro de 1 a 2 horas de haber penetrado al ovocito, y el pronúcleo masculino se forma de 3 a 5 horas. (c)

La fecundación in vitro se realiza en gotas de 50-100 µl de medio tamponado (pH 7,8) y modificado según los distintos laboratorios, utilizando una proporción de 10-15 ovocitos intactos o previamente desnudados de las células del cúmulo, ya que ello podría favorecer la penetración espermática (Hawk y col., 1992).

Con una dosis aproximada de 1 millón de espermatozoides por ml de medio. In vivo, aunque se depositen millones de espermatozoides en el genital femenino, los ovocitos se enfrentan a muy pocos de ellos en el momento de la fecundación; de hecho, en hamster se ha determinado una relación cercana a 1 (Cumming y Yenagimachi, 1982).

Sin embargo, en los sistemas artificiales, se coincuban los gametos con una densidad espermática alta para reforzar la posibilidad de fecundación; pero al no existir esta eficiente selección natural previa que reduce significativamente el número de espermatozoides al momento del encuentro y reconocimiento celular, los ovocitos se enfrentan por tanto a un alto número de espermatozoides, lo que, puede derivar en problemas de poliespermia ya que, además, los ovocitos madurados in vitro no desarrollan en forma tan eficiente el bloqueo a la poliespermia como los ovocitos madurados in vivo (Leibfried y col., 1986).

Simular en mejor forma las condiciones naturales durante la fecundación in vitro, incluye también mantener una atmósfera de CO₂ (5%) y una temperatura adecuada (39°C)

Para lograr un buen porcentaje de fertilización hay que incubar por 24 horas después de la maduración y fertilización. Si se observan los 2 cuerpos polares dentro del gameto femenino quiere decir que se llevó a cabo la fertilización.

Antes de la fertilización generalmente se retiran las células del cúmulus de los ovocitos maduros, y este proceso se puede realizar por pipeteo o la adición de citrato de sodio al 3%, sin efectos adversos, con el propósito de limpiar al ovocito.
(2)

5.1 Calidad embrionaria.

5.1.1 Categoría A: Embrión de óptima calidad con máxima capacidad de implantación y congelación.

5.1.2 Categoría B: Embrión de buena calidad con elevada capacidad de implantación y congelación.

5.1.3 Categoría C: Embrión regular con bajas posibilidades de implantación

5.1.4 Categoría D: Embrión de mala calidad con muy pocas posibilidades de implantación.

5.2 Estadios embrionarios

Los estadios embriones son las diferentes etapas del desarrollo de un embrión y se clasifica de la siguiente manera.

5.2.1 Mórula

Las blastómeras individuales son difíciles de diferenciar una de otra. La masa celular del embrión ocupa la mayoría del espacio perivitelino.

5.2.2 Mórula compacta.

Las blastómeras individuales tienen una masa compacta. La masa embrionaria ocupa 60 a 70 % del espacio perivitelino.

5.2.3 Blastocisto temprano.

Es un embrión que ha formado una cavidad llena de fluido y da una apariencia general de un anillo. El embrión ocupa 70 a 80 % del espacio perivitelino; es la fase de transición de una mórula tardía a un blastocisto.

5.2.4 Blastocisto.

Hay una diferenciación marcada de la capa del trofoblasto más externa y la masa celular interna (MCI) más compacta y oscura. El blastocele es bien prominente con el embrión ocupando la mayor parte del espacio perivitelino

5.2.5 Blastocisto expandido.

El diámetro del embrión incrementa dramáticamente con el consecuente adelgazamiento de la zona pelúcida.

5.2.6 Blastocisto eclosionado o liberado.

Cuando la cavidad del blastocisto se ha expandido completamente, el embrión rompe la zona pelúcida y se libera. El embrión liberado es redondeado hasta el doceavo día, pero después se hace oval, y rápidamente aumenta de tamaño.

CAPITULO II

6. METODOLOGÍA DEL ENSAYO

6.1 MATERIALES Y MÉTODOS

En el capítulo segundo se detalla la metodología utilizada en la investigación, características y ubicación del lugar donde se realizó el experimento.

6.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

6.3 Ubicación del ensayo

- **Provincia:** Cotopaxi
- **Cantón:** Latacunga
- **Parroquia:** Eloy Alfaro
- **Barrio:** Salache Bajo
- **Sector:** Salache

6.4 Condiciones Meteorológicas

- **Altitud:** 2703,04 msnm (PARTE BAJA)
- **Temperatura Promedio Anual:** 13°
- **Humedad Relativa:** 3 %
- **Pluviosidad:** 250 – 500mm
- **Nubosidad :** Irregular
- **Clima :** Seco Templado
- **Velocidad del Viento :** 22m / seg

Fuente: Universidad Técnica de Cotopaxi

7. UNIDAD EXPERIMENTAL

La presente investigación se realizó con 3 alpacas hembras y un macho mayores de tres años de edad, posteriormente se trabajó en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

7.1 Material experimental

- Alpacas
- Ovarios
- Ovocitos
- Semen de alpaca

7.2 Materiales de campo

- Vagina artificial artesanal
- Hormona FSH (folltropin)
- Maniquí de alpaca
- Overol
- Botas de Caucho
- Cuerdas de sujeción
- Ecógrafo
- Guantes Ginecológicos
- Guantes de Manejo
- Lubricante
- Vitaminas
- Desparasitarte

7.3 Materiales de laboratorio

- Jeringuilla de 5 ml
- Agujas de 18 G x 1 ½
- Cajas Petri 90x15mm

- Bisturí N° 20
- Guantes quirúrgicos
- Micro pipetas
- Puntas de micro pipetas
- Pipetas pasteur
- Vagina artificial
- Maniquí para recolección de semen de grupa
- Fundas herméticas
- Cámara de Neubauer
- Tubos de centrifuga
- Porta objetos
- Incubadora Memmert
- Cámara de flujo laminar
- Estereoscopio
- Microscopio
- Plancha térmica
- Centrífuga
- Vortex
- Tanque de mezcla de gases

7.4 Medios:

- Medios de maduración para ovocitos
- Medios de fertilización.
- Percoll
- Heparina
- Aceite mineral
- Medios de maduración de embriones

7.5 Materiales para laparotomía Exploratoria de Ovario

- Xilacina
- Ketamina
- Hilo vicril
- Hilo Seda
- Equipo de Disección
- Campos Quirúrgicas
- Antibióticos
- Lactato de ringer
- Reverin

7.6 Materiales de oficina

- Papelería
- Computadora
- Flash memory
- Bolígrafos
- Lápiz
- Libreta de apuntes
- Calculadora

7.7 Métodos:

7.7.1 Inductivo

Este método científico nos permitió; clasificar, comparar y registrar los resultados obtenidos en nuestra investigación de producción invitro de embriones de alpacas con el fin de obtener conclusiones generales

7.7.2 Descriptivo

Se utilizó este método en nuestra investigación ya que se detalló las características más importantes de la técnica de producción invitro de embriones en Alpacas lo

que permitió obtener información tanto de fuentes primarias como secundarias en relación al tema de estudio, sus causas efectos y resultados

8. DISEÑO ESTADÍSTICO

Se aplicó un diseño no experimental. Para la interpretación de los resultados se utilizó gráficos, tablas

8.1. Variables Evaluadas

8.1.1 Fertilización:

Se registró una cantidad de gametas femeninas (óvulos) maduros obtenidos de los cuales se obtuvo un porcentaje de fertilización de los mismos mediante la siguiente fórmula.

$$\% \text{ fertilización} = \frac{\text{Cantidad de ovocitos fertilizados}}{\text{Cantidad de ovocitos inseminados}} \times 100$$

8.1.2 Cantidad de embriones recuperados:

El conteo de embriones recuperados se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Reproducción mediante la observación con un estereoscopio a un aumento de 40x los mismos que posteriormente fueron registrados y expresados en representaciones graficas

8.1.3 Calidad Embrionaria

Se determinó mediante la observación con un estereoscopio y se dividió en categorías según los aspectos morfológicos (# de células, grado de fragmentación, presencia de vacuolas y desarrollo del embrión).

9. MANEJO DEL ENSAYO

9.1 Preparación de los animales

TABLA. 3.- Protocolo de desparasitación y vitaminización

Uso terapéutico	Principio activo	Nombre comercial	Dosis	Fecha de aplicación
Desparasitante interno y externo	Doramectina	Dectomax	1ml / 50Kg	15 de Octubre
Complejo vitamínico	Selenio, Fosforo, Yodo y Zinc	Vitasel	1ml / 20Kg	15 de octubre -22 de Octubre -29 de Octubre
	Vitamina A 500.000 UI, Vitamina D3 75.000 UI.	Inyacom ADE	2 ml Dosis única	15 de Octubre

Fuente: Directa.

Elaborado por: Culcay I. Sarzosa S.

Luego de haber adquirido las Alpacas se las sometió a un protocolo de desparasitación y vitaminización con el objetivo de tener animales aptos para ser sometidos al protocolo de súper estimulación ovárica.

9.2 Protocolo de súper estimulación ovárica

Se aplicó un protocolo de súper estimulación ovárica a cada una de las alpacas con el fin de obtener una mayor cantidad de folículos y ovocitos por ovario.

TABLA. 4.- Protocolo de súper estimulación ovárica en Alpaca

HORMONA	DÍA DE APLICACIÓN	HORA DE APLICACION	DOSIS
FSH (Folltropin)	Día 1	9h00 – 21h00	1,35 ml (27mg)
FSH (Folltropin)	Día 2	9h00 – 21h00	0,75mls (15mg)
FSH (Folltropin)	Día 3	9h00 – 21h00	0,55 ml (11mg)
FSH (Folltropin)	Día 4	9h00 – 21h00	0,55 ml (11mg)

Fuente: Directa

Elaborado por: Culcay. I, Sarzosa S.

Se administró la hormona FSH (Folltropin) por un periodo de 4 días cada 12 horas en dosis descendientes aplicando un total de 6, 40 ml (128mg) por cada alpaca.

9.3 ENSAYO EN LABORATORIO

9.3.1 Día 1

9.3.1.1 Fase 1: Aspiración de ovocitos mediante Laparotomía exploratoria de ovario y preparación de medios

- ✓ Se realizó la capacitación de los medios dos horas antes para que se regule la temperatura y el pH con el objetivo de evitar un shock térmico.

- ✓ El Medio de maduración de ovocitos; se preparó en una caja Petri de 90x15mm con 2 microgotas de 50 ul. Recubierta con aceite mineral (Sigma). A una temperatura de 38,5 °C seguidamente se llenó la funda hermética con la mezcla de gases (CO₂ = 5%, O₂ = 5%, N = 90% y se selló.

La aspiración de folículos se realizó con agujas de 18 G acopladas a jeringuillas de 10 ml. Al líquido folicular aspirado se administró heparina para evitar la coagulación por la presencia de sangre.

9.3.1.2 Fase 2: Observación de CCO y protocolo de maduración

- Colocamos el líquido folicular en la caja Petri para observar con el estereoscopio y recolectamos los complejos ovocito cumulus con una micro pipeta.
- Los complejos ovocito cumulus recolectados del líquido folicular se transfirió a una caja Petri con 3 microgotas de holding para realizar el lavado antes de ser colocados en el medio de maduración.
- Después del lavado, los complejos ovocito cumulus son puestos en el medio de maduración (pre equilibrado). Colocamos los complejos ovocito cumulus en una gota de 50 ul.
- Colocamos la caja Petri con ovocitos en la cámara de CO₂ a una temperatura de 38,5 °C con una concentración de CO₂ al 5 % durante 24 horas.

9.3.2 Día 2

9.3.2.1 Fase 3: Extracción y Recolección del semen

- Se preparó la vagina artificial colocando agua a una temperatura de 40°C, se administró aire por la válvula para generar un bar de presión. Y alrededor de la vagina artificial se colocó mantas térmicas para mantener la temperatura.

- Se colocó el maniquí a una hembra receptiva.
- Se esperó alrededor de 15 a 20 minutos para poder extraer el semen debido al tiempo de cópula de esta especie.
- Se recolectó 2ml de semen en un tubo de ensayo cónico se mantuvo la temperatura a 38°C mediante un termo y se llevó de inmediato al laboratorio.
- Realizamos la valoración de forma, motilidad, concentración de la muestra colectada a utilizar en la práctica.
- Se diluyó el semen obtenido con 1 ml de triladyl y homogenizado en vortex para reducir su viscosidad para poder ser preparado fácilmente.

9.3.2.2 Fase 4: Purificación de semen en percoll

Preparamos el semen mediante la gradiente de percoll

- Colocamos 2ml de percoll con una gradiente de 45 y 90 en un tubo de centrifuga y 2ml de semen en el mismo tubo posteriormente centrifugamos durante 10 min a 1000 revoluciones y repetimos el proceso una vez más.
- Retiramos el sobrenadante y aspiramos el pelet con la utilización de una micropipeta posteriormente se colocó en la plancha térmica a 37°C

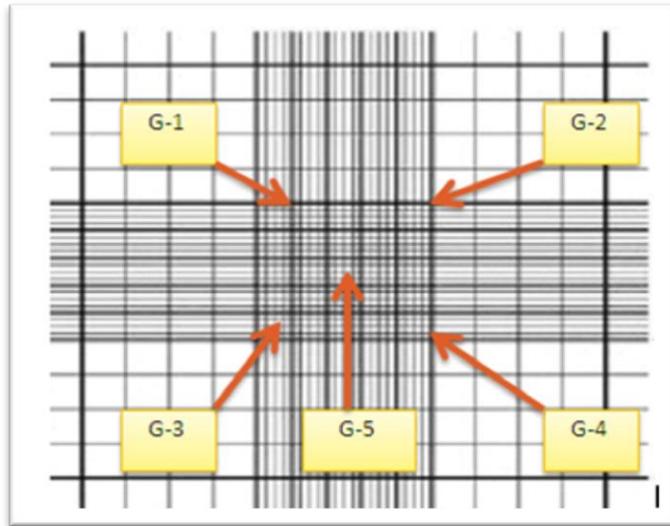
9.3.2.3 Fase 5: Determinación de la concentración espermática y fertilización in vitro.

- Para la determinación de la concentración espermática realizamos una dilución del semen en 5ul de semen purificado con 95ul de agua destilada y homogenizamos durante 5 segundos en el vortex.
- Tomamos una parte de esta dilución y colocamos en la cámara de Neubauer y observamos en el microscopio con lente 40x.

- Debido al tiempo corto que se contaba se realizó un conteo rápido.

Para el recuento rápido contamos los espermatozoides de 5 cuadrantes (G-1, G-2, G-3, G-4 y G-5)

GRÁFICO. 12.- Representación gráfica de Cuadrantes de Cámara de Neu Bauer para conteo espermático.



Fuente: Directa
Elaborado por: Culcay. I, Sarzosa S.

TABLA. 5.- Numero de espermatozoides por cuadrante

GRUPOS DE 25 CUADROS	N.- ESPERMATOZOIDES
G1	11
G2	14
G3	12
G4	11
G5	10

Fuente: Directa
Elaborado por: Culcay. I, Sarzosa S.

Media: $11+14+12+11+10 = 58 / 5 = 11,6$

$$\frac{X \text{ espermatozoides}}{Y \text{ cuadros}} \times \frac{\# \text{ cuadros cámara}}{\text{volumen cámara}} \times \frac{100\text{mm}^3}{1\text{cm}^3 \text{ (o 1ml)}} = \boxed{X \text{ millones de espermatozoides/ml}}$$

$$\frac{11,6}{25} \times \frac{400}{0.1\text{mm}^3} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1\text{cm}^3 \text{ (o 1ml)}} = \boxed{18.56 \text{ millones de espermatozoides / ml}}$$

9.3.2.4 Fase 6: Inseminación de los ovocitos maduros.

- Se observó previamente las micro gotas con medio de maduración que contenían a los ovocitos y se seleccionó los maduros para su inseminación.
- Los ovocitos maduros se colocaron en un crio tubo y se removió los cúmulos con ayuda del vortex.
- Los ovocitos maduros se colocaron en medio de fertilización pre equilibrado y fueron inseminados con 2, 538.000 de espermatozoides (27 ul de los espermatozoides purificados). Las cajas Petri se colocaron en la funda gaseada con la mezcla de gases y colocada en la incubadora a una temperatura de 38,5 °C. durante 12 horas.

9.3.2.5 Fase 7: Ovocitos fertilizados.

- Se valoraron los ovocitos a las 2, 4, 6, 8, 12, y 48 horas y luego a los 4, 5, 6, 7 días post fecundación.
- Una vez que hemos confirmado si algún ovocito fue fertilizado lo trasladamos al medio de manutención de embriones.

CAPITULO III

10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente Capitulo se detallan los resultados obtenidos en nuestra investigación para su posterior análisis.

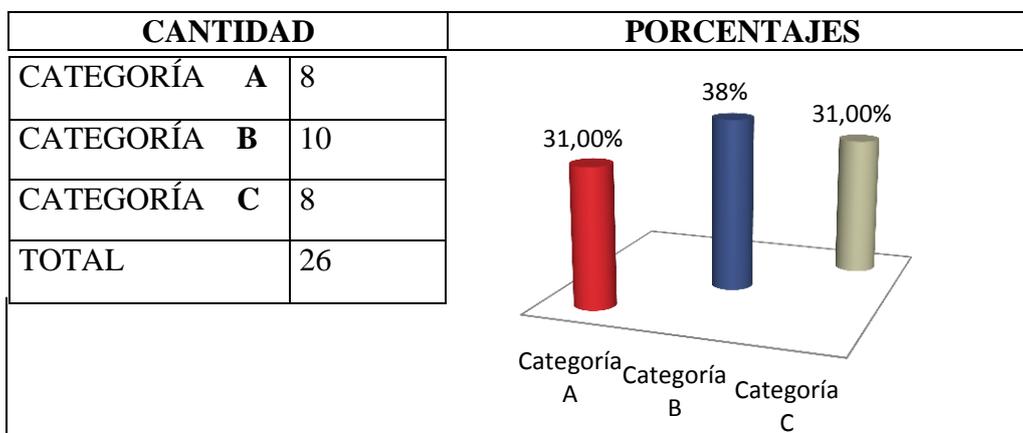
TABLA. 6.- Obtención de Ovocitos

OBTENCION DE OVOCITOS	
N° De Ovarios	6
N° de Folículos Aspirados	30
Ovocitos Maduros	10
Ovocitos inmaduros	16
Total de ovocitos obtenidos	26

Fuente: Directa
Elaborado por: Culcay I, Sarzosa S.

Se indica el número de ovarios utilizados, el número de folículos aspirados y el total de ovocitos obtenidos tanto maduros como inmaduros para el desarrollo de la investigación.

GRÁFICO. 13.- Categorización de ovocitos



Fuente: Directa
Elaborado por: Culcay I, Sarzosa S.

En la investigación se obtuvo un total de 26 ovocitos, 8 ovocitos categoría A que representa el 31 %, 10 ovocitos categoría B que representa el 38 % y 8 ovocitos categoría C que representa el 31 % de ovocitos obtenidos.

Estos resultados difieren a los reportados por Gonzales et al 1992 quien con la técnica de aspiración folicular encontró 40,3 %, 48,3%, y 10,9 % de ovocitos para las respectivas categorías.

Gómez et al, 2002. Cita que con la Técnica de Aspiración folicular mediante laparotomía se ha aspirado más del 80% de ovocitos Categoría A.

TABLA. 7.- Maduración de ovocitos

MADURACION DE OVOCITOS		
	Cantidad	Porcentajes
Ovocitos sometidos a maduración	18	100%
Ovocitos maduros	11	39%
Ovocitos Degenerados	7	61%

Fuente: Directa
Elaborado por: Culcay I, Sarzosa S.

Se sometieron a capacitación 18 ovocitos los mismos que eran de categoría A y B que representa el 100% de estos se capacitaron óptimamente 11 ovocitos que representa el 61 % y 6 ovocitos no capacitados degenerados que representa el 39%.

Miragaya (2002). Estudio la maduración In Vitro de ovocitos, obtenidos por aspiración luego de un protocolo de estimulación ovárica, obteniendo una maduración de 72 %, similar al reporte de Del Campo et al (1992).

TABLA. 8.- Inseminación y fertilización de ovocitos

Ovocitos inseminados		Ovocitos Fertilizados		Ovocitos no Fertilizados	
11	100%	4	36%	7	64%

Fuente: Directa
Elaborado por: Culcay. I, Sarzosa S.

Estudios de Del Campo et al 1994. Sobre Fertilización In Vitro de ovocitos en camélidos señalan una tasa de desarrollo al estadio de pronúcleo del 29.2 y 57.1 %.

TABLA. 9.- Producción de embriones

CATEGORIA	Nº DE EMBRIONES	PORCENTAJE %
A	0	0 %
B	0	0%
C	1	33,3%
D	2	66,7 %
	total	3
		100%

Fuente: Directa
Elaborado por: Culcay. I, Sarzosa S.

Se observa que de 3 embriones producidos que representa el 100% 1 embrión (33,30%) fue de categoría C y 2 embriones (66,70 %) fueron de categoría D.

Huanca et al et al (2006) reporta la recuperación de 4.8 ± 0.9 embriones entre categoría A y B equivalente a una tasa de recuperación del 66,1% de embriones transferibles de alpaca.

Taylor et al 2001 Igualmente ha reportado la recuperación de 37 embriones de 47 hembras no estimuladas (79 %), de las cuales resultaron en un 41 % de preñez al ser transferidas a receptoras.

10.1 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

10.1.1 CONCLUSIONES.

El número de ovocitos recuperados aptos para capacitación fue bajo , solamente se utilizó ovocitos con al menos una capa de células de cúmulus y un citoplasma homogéneo los mismos que no maduraron adecuadamente debido a la presencia de elementos foliculares que impiden la maduración como son liquido folicular , sangre, adherencias, etc.

El porcentaje de maduración de ovocitos fue del 39% y ovocitos degenerados en un 61% lo que indica claramente que no se obtuvo un porcentaje considerable de ovocitos viables para ser sometidos a fertilización.

En nuestra investigación se sometieron a inseminación 11 ovocitos de los que 4 ovocitos fertilizaron de forma normal presentando dos pronúcleos, uno masculino y otro femenino, y una cola de espermatozoide. Y 7 ovocitos no fertilizados adecuadamente presentando diferentes características como retraso en la formación de los pronúcleos, ovocitos detenidos en telofase II, y ovocitos que presentaron más de dos pronúcleos y dos corpúsculos polares.

Los embriones que se obtuvo fueron de mala calidad, teniendo; 1 embrión de categoría C y 2 embriones de categoría D los mismos que no son viables para ser transferidos ni crios conservados.

El desarrollo de la técnica de producción invitro de embriones empleada puede ser viable de ejecutar con mejores resultados teniendo, en cuenta las mejoras que se pueden realizar a la misma.

10.1.2 RECOMENDACIONES

Existe una limitada disponibilidad de Ovarios de Alpaca provenientes del matadero lo cual impide mayor investigación en la estandarización de una técnica de producción in vitro de embriones. Por lo que es una buena opción la recolección de ovocitos mediante la técnica de Aspiración folicular mediante laparotomía exploratoria del Ovario. Teniendo en cuenta la presencia de elementos folicular que pueden afectar el proceso.

Ovocitos provenientes de ovarios súper estimulados pueden presentar diferentes inconvenientes al momento de ser sometidos a maduración o capacitación pudiendo estos degenerarse, por lo que es importante tener en cuenta estos factores con el fin de tener mejores resultados

Se debe investigar sobre métodos de congelación y crio conservación de semen de alpaca así se evitara muerte espermática en el transcurso desde la toma de la muestra hasta el lugar del laboratorio.

La producción In vitro de Embriones de Alpaca es una biotecnología de la reproducción muy importante e interesante por lo que se recomienda continuar con dicha investigación teniendo en cuenta las debidas mejoras que se deben realizar a la Técnica.

10.2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 BRAVO, P. FLORES, J. GARNICA, C. ORDOÑEZ. 1996 Archivos de Medicina Veterinaria Recolección de semen e inseminación artificial de alpacas chile 1996

2 CORREA .E, RATTO M, GATICA R. Universidad Austral de Chile Facultad de Ciencias Veterinarias, Archivos de medicina Veterinaria, Valdivia Chile 1994 pág. 59- 63.

3 DEL CAMPO. M, DONOSO. M, DEL CAMPO CH, ROJO R, BARROS C, PARRISH J, MAPLETOFT J. 1992. 12 Congreso Internacional de Reproducción Animal. Maduración in vitro de ovocitos de la llama (Lama glama). Pág. 1984

4 FAO 1996 Manual de prácticas de manejo de Alpacas y Llamas, Roma 1996, ISBN 92-5-303903-5: pág. 9-14, 30 – 34, 42- 47

5 FERNÁNDEZ, S. y CALDERON, M. 1966. Métodos de colección de semen de la Alpaca. México 1996

6 FERNANDEZ, BACA S. 1991. Avances y perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos. Chile 1991 pag. 429

7 FRANK E. Universidad Católica de Córdoba, Curso de Manejo Reproductivo de camélidos sudamericanos domésticos Argentina pág. 3-8

8 GARCÍA, W. PEZO, D. SAN MARTIN F. OLAZABAL J, FRANCO, F. 2005 Manual del Técnico Alpaquero, Lima 2005 ISBN. 9972- 47 – 113 – 6, pág. 9 - 30

9 GIULIANO, S. TRASORRAS, V. y MIRAGAYA, M. Memorias del II Simposium internacional de investigaciones sobre camélidos sudamericanos. Arequipa Perú

10 HUANCA, W. CORDERO, A. HUANCA, T. GREGG P 2007. Biotecnologías reproductivas en Camélidos sudamericanos domésticos: avances y perspectivas Cusco – Perú. 2007 pág. 197- 198

11 NOVOA, C. RUIZ, E. RIVERA, B. RUIZ, A. 1998. Reproducción animal métodos de estudio en sistemas Costa Rica. Noviembre 1998 ISBN 92-9039-384

12 RAGGI, L. 2012 Resumen y trabajos - vi congreso mundial de camélidos sudamericanos - Arica – Chile Noviembre 2012 pág. 12 - 2713 RIVAS R.

13 Manual de prácticas de Biología de la Reproducción. México 2011 pág. 5-9

14 SEGOVIA, F. y ARGÜELLO, M. 2010 Quinto foro: La realidad de las alpacas en el Ecuador una visión para el futuro, Quito Marzo de 2010, ISBN 978-9978-22-988-0

15 SEPULVEDA, N. 2011 Manual para el manejo de camélidos sudamericanos domésticos, Chile Abril del 2011 ISBN N° 978-956-328-089-0 PAG 18

16 VILCA, J. 2008. Presentación Camélidos y Población San Pablo. Riobamba-Ecuador.

10.2.1 CITAS VIRTUALES

a) Animalandia. *Un espacio para la biodiversidad animal* Disponible en URL: <http://herramientas.educa.madrid.org/animalandia/fichataxonomica.php?id=1891&nivel=Subclase&nombre=Eutheria> (Consultada el 15 de enero del 2013)

b) Agropecuarios, *Características de la producción in vitro de embriones*, Disponible en URL: <http://agropecuarios.net/caracteristicas-de-la-produccion-in-vitro-de-embriones.html> (Consulta el 10 de enero del 2013)

- c) Berg, U. Reichenbach, H. *Reprobiotec* Disponible en URL: http://www.reprobiotec.com/libro_rojo/capitulo_11.pdf (Consultada el 10 de enero del 2013)
- d) Cervantes, M. Huanca, T. Palomino, J. Huanca, W. *Sitio Argentino de Producción Animal*. Disponible en URL: http://www.produccionbovina.com/produccion_de_camelidos/reproduccion/131-Cervantes_FSH.pdf (Consultada el 12 de abril del 2013)
- e) Dávalos, R. Olazabal, J. *evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas* Disponible en URL: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v13n2/a16v13n2.pdf> (Consultada el 8 de abril del 2013)
- f) Embryotech, *Producción in Vitro (PIV) comúnmente llamada FIV "Fertilización in Vitro"*. Disponible en URL: http://www.embryotechcr.com/embryotech/index.php?option=com_content&task=view&id=102&Itemid=78 (Consultada el 9 de Mayo del 2013)
- g) Fao 1996. *Manual de Practicas de manejo de Alpacas y Llamas* Disponible en URL: <http://www.fao.org/docrep/014/w3341s/w3341s.pdf> (Consultada el 4 de febrero del 2013)
- h) La Luz - Oro de los Andes *Historia de las Alpacas* Disponible en URL: <http://mylaluz.wordpress.com/es/storiadelasalpacas/> (Consulta el 7 de enero del 2013)
- i) Machaca, M. *Anatomía de los Órganos sexuales de la Alpaca* Disponible en URL: <http://es.scribd.com/doc/90286697/Anatomia-de-Los-Organos-Sexuales-de-La-Alpaca> (Consultada el 15 de febrero del 2013)
- j) Pacheco, C. *Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos* Disponible en URL:

http://www.produccionbovina.com/produccion_de_camelidos/reproduccion/157-semen.pdf (Consultada el 5 de febrero del 2013)

k) Portal de relaciones *Públicas Técnicas de Investigación* Disponible en URL: <http://www.rrppnet.com.ar/tecnicasdeinvestigacion.htm> (Consultada el 10 de enero del 2013)

l) Red vet. *Reproducción Animal* Disponible en URL: <http://reproduccionanimal.org/site1/images/stories/reproduccion/revista01/19-21-Trasorras-camelidos.pdf> (Consultada el 13 de febrero del 2013)

m). Sappía, D. *Laparotomía en Pequeños Animales* Disponible en URL: <http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Cirugia%20general/Nueva/2012/12%20LAPAROTOMIA FELINOS.pdf> (Consultada el 6 de Mayo del 2013)

n). Segovia, F. *Foro Realidad de las Alpacas en el Ecuador Una visión Para el futuro* Disponible en URL: http://www.infoandina.org/sites/default/files/recursos/la_realidad_de_las_alpacas_en_el_ecuador.pdf (Consulta el 7 de enero del 2013)

ñ). Scielo Chile, *Scientific Electronic Library*, Disponible en URL: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301732X2006000200002&script=sci_arttext (Consulta el 3 de enero del 2013)

o) Scielo, *Scientific Electronic Library*, consideraciones sobre la dinámica folicular en Camelidos, Disponible en URL: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1668-34982006000100018&script=sci_arttext (Consultada el 13 de febrero del 2014)

p) Scribd.com *Digital Library*. Sistema reproductor en mamíferos, Disponible en URL: <http://es.scribd.com/doc/110945298/Aparato-Reproductor-de-Los-Vertebrados-Morfologia-Externa> (Consultada el 13 de febrero del 2014)

q) Scielo *versión On-line* ISSN 1668-3498. Buenos aires 2006. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en camélidos sudamericanos. Disponible en URL: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0004-05922011000400017&script=sci_arttext (consultada el 14 de febrero del 2014)

r) Trasoras, V. *producción de embriones in vivo e in vitro en camélidos sudamericanos*. Disponible en URL: <http://www.reproduccionanimal.org/site3/files/revistas/spermova2/19-21-Trasorras-camelidos.pdf> (Consulta el 8 de abril del 2013)

s) Wikipedia, *La Enciclopedia libre*, Disponible en URL: http://es.wikipedia.org/wiki/Investigaci%C3%B3n_descriptiva (Consultada el 10 de enero del 2013)

t) Ropero A. *blogspot*, desarrollo folicular y foliculogénesis, Disponible en URL: <http://las-hormonas.blogspot.com/2013/11/como-se-producen-los-ovulos-ovogenesis.html> (Consultada el 14 de febrero del 2014)

ANEXOS

ANEXO. 1.- CONSTRUCCION DE MANQUI DE ALPACA



ANEXO. 2.- VAJINA ARTIFICIAL PARA EXTRACCION DE SEMEN DE ALPACA



ANEXO. 3.- MANTAS TERMICAS COLOCADAS EN LA VAGINA ARTIFICIAL



ANEXO. 4.- ENSAYO EN ALPACA



ANEXO. 5.- ADECUACIONES EN EL MANIQUI DE ALPACA



ANEXO. 6.- ARMADO DE MANIQUI



ANEXO. 7.- ADMINISTRACION DE LA HORMONA FSH (FOLLTROPIN)



ANEXO. 8.- PREPACION DE LOS ANIMALES PARA LA CIRUGIA



ANEXO. 9.- CIRUGIA INCISIÓN DE LÍNEA ALBA Y PERITONEO



ANEXO. 10.- IDENTIFICACIÓN DEL ÚTERO



ANEXO. 11.- IDENTIFICACIÓN DE ÓRGANOS



ANEXO. 12.- EXPLORACIÓN DEL OVARIO SUPEROVULADO



ANEXO. 13.- ASPIRACION FOLICULAR



ANEXO. 14.- SUTURA DE LOS ANIMALES



ANEXO. 15.- FINALIZACION DE LAPARATOMIA EXPLORATORIA DEL OVARIO



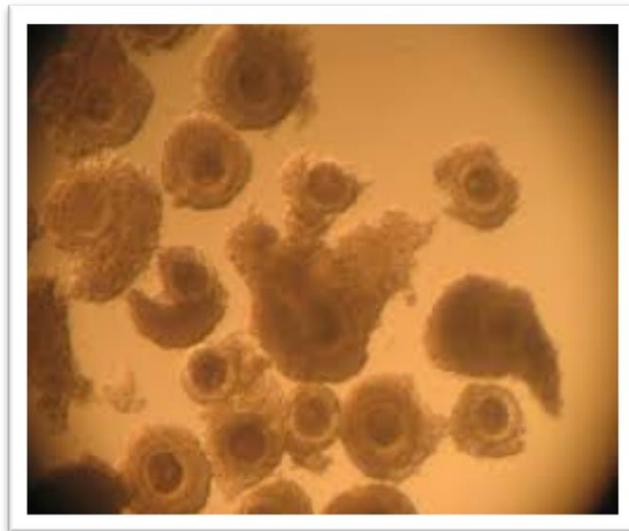
ANEXO. 16.- OBSERVACION DE OVOCITOS MEDIANTE ESTEREOMICROSCOPIO



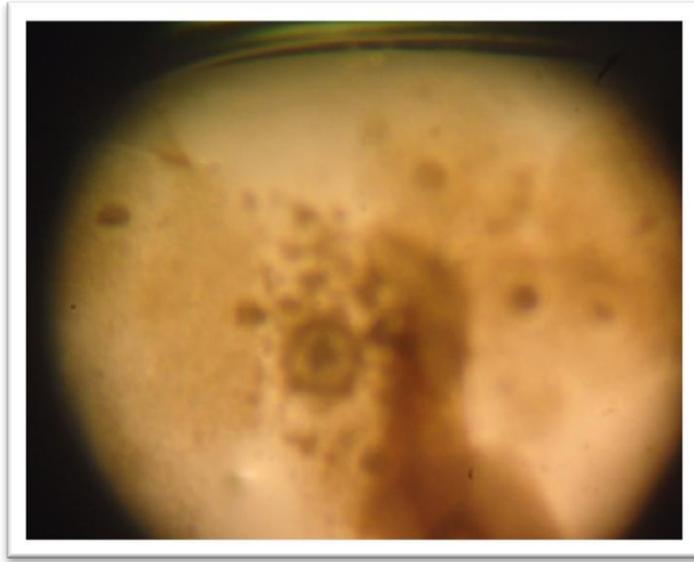
ANEXO. 17.- ASPIRACION DE OVOCITOS VIABLES



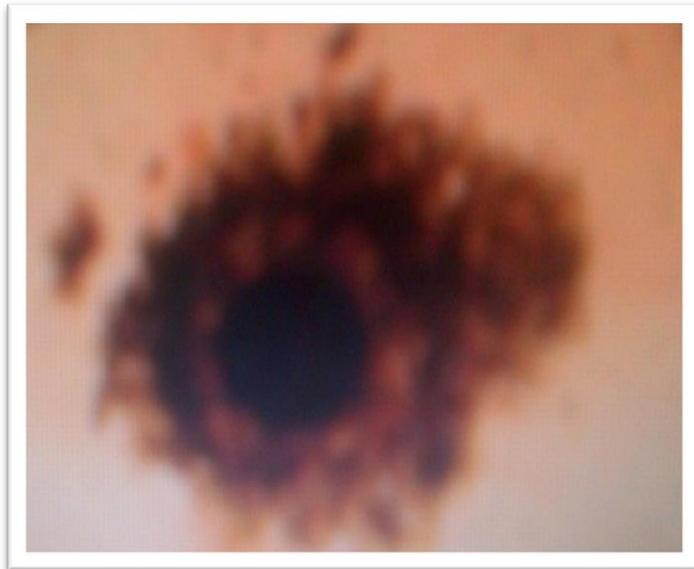
ANEXO. 18.-- OVOCITOS OBSERVADOS MEDIANTE ESTEREOMICROSCOPIO



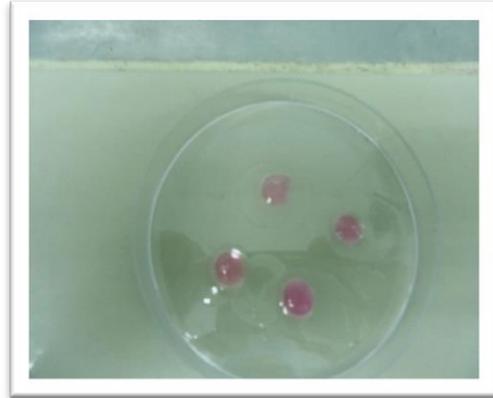
ANEXO. 19.- OVOCITOS NO APTOS PARA MADURACION



ANEXO. 20.- OVOCITOS POST 24 HORAS DE MADURACION



ANEXO. 21.- MICROGOTAS DE MEDIO DE MADURACION



ANEXO. 22.- EXTRACCION DE SEMEN DE ALPACA



ANEXO. 23.- MUESTRA DE SEMEN



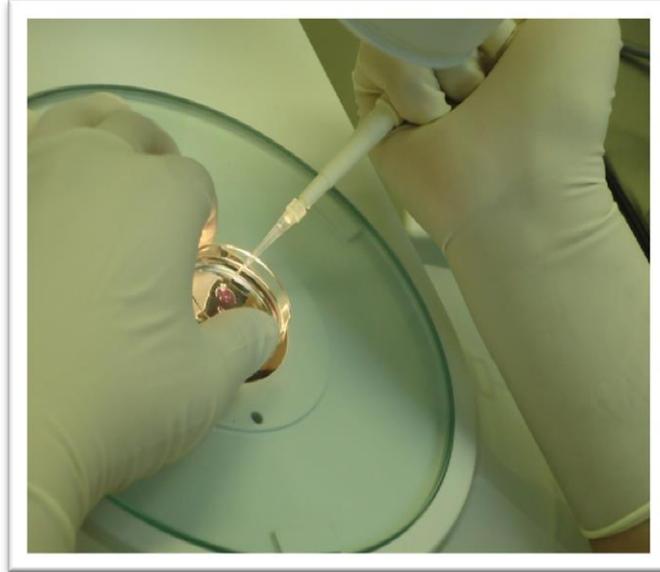
ANEXO. 24.- TUBO DE CENTRIFUGA CON PERCOLL Y SEMEN DE ALPACA



ANEXO. 25.- CAMARA DE NEUBAUER PARA CONTEO ESPERMATICO



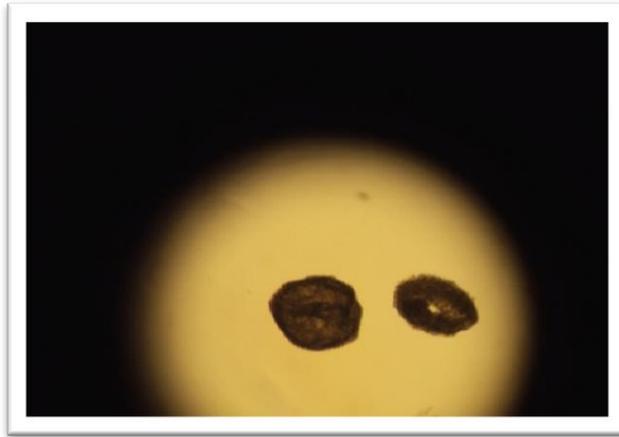
**ANEXO. 26.- ADICION DE ESPERMATOZOIDES A LA MICROGOTA
CON OVOCITOS**



**ANEXO. 27.- INCUBADORA PARA PRODUCCION INVITRO DE
EMBRIONES**



ANEXO. 28.- EMBRIONES PRODUCIDOS (Categoría D)



ANEXO. 29.- EMBRIONES PRODUCIDOS (Categoría C)

