

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**



**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
RECURSOS NATURALES**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

**TESIS DE GRADO**

**PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO  
VETERINARIO Y ZOOTECNISTA.**

**TÍTULO:** “EVALUACIÓN DE LA CRIOCONSERVACION DE OVOCITOS EN LLAMAS (*Lama glama*) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”.

**AUTOR**

**JENNIFER INESITA SÁNCHEZ ECHEVERRÍA**

**DIRECTOR**

Dr. EDWIN ORLANDO PINO PANCHI

**LATACUNGA – ECUADOR**

**2013**

**AUTORÍA**  
**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**

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

**DECLARACIÓN DEL AUTOR**

“La responsabilidad del contenido de esta investigación, el análisis realizado, las conclusiones y recomendaciones de la presente tesis pertenece única y exclusivamente a la autora: Jennifer Inesita Sánchez Echeverría; y el patrimonio intelectual de la misma a la UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”.

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

Atentamente

Jennifer Inesita Sánchez Echeverría  
C.I.: 1717579591

## 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 CRIOCONSERVACION DE OVOCITOS EN LLAMAS (*Lama glama*) EN EL LABORATORIO DE LA BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”**, propuesto por la alumna Jennifer Inesita Sánchez Echeverría, presento el **Aval Correspondiente** de este trabajo de tesis.

Atentamente

Dr. Edwin Orlando Pino Panchi  
**Director de Tesis**

## **AVAL TRIBUNAL DE TESIS**

Nosotros, Dra. Mercedes Toro, Dra. Nancy Cueva y Dra. Jaine Labrada  
catedráticos y miembros del tribunal del trabajo de Tesis “**EVALUACIÓN DE  
LA CRIOCONSERVACION DE OVOCITOS EN LLAMAS (*Lama  
glama*) EN EL LABORATORIO DE LA BIOTECNOLOGÍA DE LA  
REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA  
DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**”, propuesto por la  
alumna Jennifer Inesita Sánchez Echeverría, presentamos el **Aval  
Correspondiente** de este trabajo de tesis.

Atentamente

Dra. Mercedes Toro

**Presidente del Tribunal**

Dra. Nancy Cueva

**Miembro del Tribunal**

Dra. Jaine Labrada

**Miembro Opositor**

## DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mis padres René Sánchez Jarrin y Blanca Cecilia Echeverría Gutiérrez por su amor, comprensión, educación, entrega, enseñanzas y apoyo.

A mis abuelitos Gualberto Echeverría, José Sánchez e Inés Gutiérrez, porque sé que desde el cielo me observan con mucho amor y felicidad y estoy segura se sienten orgullosos por todo esto.

A mis hermanos Paul y Patricia por su cariño, comprensión y soporte.

A mis tíos Beatriz, Patricio, Olga, Eva por su amor, apoyo y por ser un buen ejemplo de lucha, dedicación y responsabilidad.

A mis profesores, quienes con su sabiduría y paciencia han logrado infundirme sus conocimientos en todos los años de formación estudiantil y así poder ser un profesional de éxito.

*Jennifer Inesita Sánchez Echeverría*

## AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios por protegerme durante todo mi camino y proporcionarme las fuerzas necesarias para superar obstáculos y dificultades a lo largo de toda mi vida.

A mi director de tesis. Dr. Edwin Pino, por su paciencia, dedicación, nobleza y apoyo durante la realización de esta tesis.

A mis amigos y amigas que estuvieron pendientes de la realización de mi tesis, y que estuvieron dándome ánimo para poderla concluir con éxito.

A mi familia tíos y tías primos y primas que de una u otra manera están pendientes de mí dándome su apoyo y ánimo.

Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de mi trabajo de tesis.

*Jennifer Inesita Sánchez Echeverría*

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

Portada.....	i
Declaración expresa del autor .....	ii
Aval del director de tesis .....	iii
Aval tribunal de tesis .....	iv
Dedicatoria .....	v
Agradecimiento .....	vi
Indice de contenidos .....	vii
Resumen.....	x
Abstract... ..	xi
Introducción.....	12
<b>CAPITULO I .....</b>	<b>14</b>
1. Revisión literaria.....	14
1.1 Origen del camélido sudamericano (llama) .....	14
1.2 Pubertad .....	15
1.3 Anatomía del aparato reproductor de la hembra.....	15
1.3.1 Ovarios.....	15
1.3.2 Vulva.....	16
1.3.3 Oviductos.....	16
1.3.4 Utero .....	16
1.3.5 Ligamento ancho o uterino .....	17
1.3.6 Vagina.....	17
1.4 Fisiología reproductiva de la hembra.....	18
1.4.1 Ciclo ovárico de la llama .....	20
1.5 Ovogénesis .....	20
1.5.1 ovulación .....	21
1.6 foliculogénesis .....	23
1.6.1 Dinámica folicular .....	23
1.6.2 Fases del desarrollo folicular .....	23
1.7 Dinámica folicular ovárica.....	27

1.8	Luteinización y luteólisis .....	27
1.10	Maduración de ovocitos in vitro .....	29
1.11	Evaluación y calificación de ovocitos.....	30
1.12	Características morfológicas del ovocito .....	31
1.13	Crioconservación .....	34
1.14	Vitrificación .....	35
1.15	Descongelación de ovocitos.....	36
<b>CAPITULO II</b> .....		38
2.	Materiales y Métodos.....	38
2.1	Características del área de experimento .....	38
2.1.1	Ubicación del área de estudio. ....	38
2.2	Unidad experimental.....	39
2.2.1	Muestra. ....	39
2.2.2	Materiales.....	39
2.3	Métodos y Técnicas .....	40
2.3.1	Método estadístico .....	40
2.4	Manejo del experimento. ....	42
<b>CAPITULO III</b> .....		45
3.	Resultados y Discusión .....	45
Conclusiones .....		51
Recomendaciones .....		52
Bibliografía citada .....		53
Anexos.....		58

## Índice de gráficos

Grafico 1	Estructura del aparato reproductor.....	18
Grafico 2	Desarrollo de un folículo ovárico. Fuente.- (Fiorl, 2010).....	22
Grafico 3	Folículo Primordial .....	24
Grafico 4	Folículo primario.....	24
Grafico 5	Folículo Secundario .....	25
Grafico 6	Foliculos Terceario.....	26

Grafico 7 Folículo de Graaf.....	26
Grafico 8 Proceso de maduración in vitro de los ovocitos.....	32
Grafico 9 Proceso de maduración in vitro de los ovocitos a las 36 Horas. ....	33
Grafico 10 Proceso de maduración in vitro del ovocito en Metafase II.....	33
Grafico 11 Ovocitos vitrificados descongelados.....	36
Grafico 12 Total de ovocitos.....	46
Grafico 13 Calificación de ovocitos recuperados.....	48
Grafico 14 Viabilidad.....	50

### **Índice de tablas**

Tabla 1 Clasificación de ovocitos.....	31
Tabla 2 Calificación de ovocitos.....	32
Tabla 3 Ovocitos recuperados de llamas.....	41
Tabla 4 Grados de ovocitos recuperados.....	41
Tabla 5 Dosis para súper ovulación en llamas.....	43
Tabla 6 Total de Ovocitos.....	45
Tabla 7 Calificación de ovocitos recuperados.....	47
Tabla 8 Viabilidad de ovocitos.....	49
Tabla 9 Calificación del ovocito des-vitrificado.....	50

### **Índice de anexos**

Anexo 1 Fotografías del trabajo de campo.....	58
Anexo 2 Fotografías aplicando el medicamento.....	59
Anexo 3 Chequeo ecográfico.....	61
Anexo 4 Ovarios de llamas.....	62
Anexo 5 Ovarios en el laboratorio.....	64
Anexo 6 Ovocitos.....	65
Anexo 7 Vitrificación de ovocitos.....	66
Anexo 8 ovocito des-vitrificación.....	69
Anexo 9 ovocito vista microscópica.....	70

## RESUMEN

La crioconservación del material genético de camélidos sudamericanos es una alternativa para preservar y mejorar las diferentes especies de camélidos existentes en el país; ya que esto ayuda a garantizar la calidad genética en el tiempo para experimentación y optimización reproductiva de la especie.

La crioconservación del ovocito de la llama se la realizó aplicando la técnica de vitrificación que es un proceso rápido y sencillo; y a su vez el más recomendado para preservar a los ovocitos de todas las especies.

Estas llamas fueron súper ovuladas para una mayor eficacia con el fin de obtener la mayor cantidad de ovocitos en metafase II; ya que el objetivo primordial de este trabajo es el mejoramiento genético y repoblación de camélidos sudamericanos (*Lama glama*), así como el evaluar la crioconservación de ovocitos del mismo.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de biotecnología de la reproducción animal de la Universidad Técnica de Cotopaxi con llamas del camal que estaban destinadas al faenamiento; con los ovarios se pudo extraer los ovocitos en metafase II los cuales fueron crio conservados con la técnica de vitrificación.

Los resultados obtenidos fueron de 20 ovocitos recolectados y 16 ovocitos vitrificados; para establecer confianza de la técnica de vitrificación se observó la viabilidad de los ovocitos congelados, la cual se realizó des-congelando el 5% del total de la muestra.

Con ello se pudo concluir que la técnica de vitrificación es apropiada para crio conservar los ovocitos ya que no hubo ningún cambio en la morfología del ovocito teniendo así un 100% de viabilidad.

## **ABSTRACT**

The cryoconservation of genetic material in southamerican camelids is an alternative to preserve and improve the different species of in the country, because this helps ensure the genetic quality in time for experimentation and optimize the reproduction of species, the oocyte cryoconservation of the Llama it is performed using the vitrification technique is a quick and simple process, and most recommended in order to maintain the oocytes of all species. These llamas were well ovulated for a greater efficiency in order to get the main quantity of oocytes at metaphase II, the first objective of this research is the genetic improvement and breeding of camelids (*Lama glama*) and to evaluate the oocyte cryoconservation. This one was performed in the of biotechnology laboratory in animal reproduction at the Technical University of Cotopaxi with llamas that were assigned for slaughter, the ovaries could be extracted the mature oocytes which were cryoconserved, it made the defrosting of 5% of the total sample; it because concluded that vitrification technique is appropriate for cryoconserved the oocytes because there was not change in the morphology of the oocytes and having a 100 % feasibility.

## INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos son especies muy importantes en la economía de los pobladores de las comunidades alto andinas, por constituir una fuente de carne, fibra y trabajo para los criadores que habitan las zonas; estos animales utilizan extensas áreas de praderas naturales, esta crianza se desarrolla en condiciones de comunidades campesinas; pero la producción y productividad es muy baja.

Es por ello que se requiere trabajar en el campo de la investigación para contribuir a mejorar los niveles de producción y productividad, tomando en cuenta que los productores desarrollan una crianza tradicional.

Se han realizado diferentes investigaciones en varios países como Perú y Chile; desarrollando alternativas en cuanto al avance de biotecnologías de la reproducción como es la inseminación artificial, la transferencia de embriones, desarrollo de protocolos de fecundación *in vitro* y criopreservación de material genético. Dando resultados favorables para la repoblación de camélidos sudamericanos en vista de ello se realizó esta investigación para incrementar bases bibliográficas en el Ecuador.

En las investigaciones realizadas se concluyó que pese a la problemática, la aplicación de biotecnologías reproductivas podría contribuir rápidamente a superar los bajos índices reproductivos logrando la obtención de animales de alto valor productivo formando núcleos genéticos que pueden proveer reproductores para los productores.

El objetivo de este trabajo es reunir la información disponible sobre el mejoramiento genético y repoblación de camélidos sudamericanos (*Lama glama*), se espera optimizar el material genético de los camélidos es así que se plantea el siguiente objetivo que es la evaluación de la crioconservación de ovocitos en llamas (*Lama glama*); despejando las dudas de la hipótesis

planteadas así como determinando las diferentes conclusiones en cuanto se refiere a la investigación.

Por lo antes expuesto el presente trabajo buscó conseguir los siguientes objetivos.

**OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar la crioconservación de ovocitos en llamas (*Lama glama*) en el laboratorio de la biotecnología de la reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Definir el total de ovocitos recolectados de los ovarios post mortem.
2. Determinar el número de ovocitos ya maduros para la crioconservación.
3. Evaluar la viabilidad de los ovocitos vitrificados mediante la descongelación del 5% del total de la muestra.

Las hipótesis que se plantearon fueron las siguientes:

**HIPÓTESIS NULA:**

La crioconservación de ovocitos de llama (*Lama glama*) no es eficiente para la crioconservación.

**HIPÓTESIS ALTERNATIVA:**

La crioconservación de ovocitos de llama (*Lama glama*) es eficiente para la crioconservación.

## CAPITULO I

### 1. REVISIÓN LITERARIA

#### 1.1 ORIGEN DEL CAMÉLIDO SUDAMERICANO

##### (Llama)

Es la forma doméstica del guanaco y fue posiblemente el primer animal que domesticó el hombre andino hace unos 8 000 años es uno de los más importantes de épocas pre-hispánicas; cuando los españoles llegaron quedaron admirados con la llama (*Lama glama*), pues a diferencia del caballo, que necesita una ración diaria de comida bien balanceada, herrajes, arnés, y silla para transportar carga, la llama posee una fisonomía apropiada para ello y puede alimentarse tan sólo con hierba que crece en cualquier lugar de los Andes; vive desde Colombia hasta Bolivia, norte de Argentina y noreste de Chile, la mayoría habita los Altos Andes, a más de 3 800 msnm., se estima que existen aproximadamente 2.5 millones de llamas a nivel mundial. **(Urrutia, 2006)**

Los camélidos pertenecen al orden de los *Artiodactyla*, son animales de ovulación inducida y de reproducción mono estacional; poseen tres estómagos y una flora ruminal activa que maximiza la utilización de la proteína y de la fibra; la primera es muy escasa en los pastos de su hábitat, pero la segunda, en cambio, abunda mucho allí, el período de vida útil es de 14 años; sin embargo, su fertilidad, bajo el control del hombre, es relativamente baja: llega al 50 por ciento. **(Cardozo, 2005)**

La llama es el camélido sudamericano de mayor tamaño pudiendo llegar entre 100 y 129 kilogramos aproximadamente. Produce una fibra más gruesa que la de la alpaca; existen dos razas de llamas C´cara (pelada) produce mayor cantidad de fibra, pero muy quebradiza; la fibra se extiende desde la frente hasta el tren posterior, sin llegar a cubrir sus extremidades. El segundo raza es

Ch'aku (lanuda) se caracteriza por tener un cuello largo y fuerte, la cara y la cabeza son limpias sin pelos. **(Sepúlveda, 2011)**

Los camélidos sudamericanos poseen ciertas características reproductivas que los hacen diferentes de otros animales de granja. Por ejemplo, las hembras en edad reproductiva muestran periodos extendidos de receptividad sexual al macho y pueden copular en cualquier época del año. La hembra es de ovulación inducida, la gestación dura aproximadamente 11,5 meses y la placenta es de tipo difuso; el macho copula entre 5 a 50 minutos emitiendo un sonido gutural característico y deposita el semen en los cuernos uterinos. **(Cardozo, 2005)**

## **1.2 PUBERTAD**

El comienzo de la pubertad de los camélidos sudamericanos es alrededor de los 12 a 13 meses, mientras que en el macho pareciera estar determinada alrededor de los 2 años de edad. La presencia de la pubertad está relacionada con el estado nutricional, alcanzándola con un 60% del peso adulto. **(Estudio FAO, 2006)**

## **1.3 ANATOMIA DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA**

### **1.3.1 Ovarios**

Son órganos pares localizados en la cavidad abdominal, están fijados por el mesovario y envueltos por la bolsa ovárica, son de forma ovalada 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, mide de ( 1,3 - 2,5 x 1,4 - 2,5 x 0,5 - 1,0 cm ), con la presencia del cuerpo lúteo, con pequeños folículos que no se pueden ser detectados por palpación (1 a 3 mm) el peso ovárico se incrementa, ya que pesa de 1,2 a 1,7 g lo que representa la mayor proporción del peso total del ovario. **(García, 2005)**

### **1.3.2 Vulva**

Externamente es el órgano más visible 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 y en algunas hembras están predispuesta a sufrir infecciones del tracto reproductivo por un problema de conformación, cuando la vulva esta demasiado inclinado hacia adelante (en vez de vertical) las heces contaminan la vagina; esto lleva a infecciones que reducen la fertilidad de la hembra. **(Estudio FAO, 2006)**

### **1.3.3 Oviductos**

Son tubos delgados y sinuosos que unen el ovario con el útero tienen un diámetro es de 2 a 3 mm, su extremidad próxima al ovario se ensancha a manera de embudo, formando una verdadera bolsa que envuelve el ovario; esta estructura sirve para recibir los óvulos liberados del ovario la porción ovárica del oviducto tiene mayor importancia en la fertilidad, ya que allí se efectúa la fecundación. **(Sepúlveda, 2011)**

### **1.3.4 Útero**

El aspecto general del útero hace acordar al de la oveja, no obstante existe una diferencia importante, tiene una marcada bifurcación de los cuernos y cuando está en relajación tiene una forma de T típica, el útero está conformado por los cuernos uterinos, el cuerpo uterino y el cérvix o cuello; el cuerno izquierdo es más largo que el derecho de 10-12 cm vs 7-8 cm y tiene un grosor de 4-5 cm en la base y 3 cm en la punta el cuerpo uterino derecho es pequeño, con no más de 2.5 cm de largo y alrededor de 5 cm de ancho, el cuello o cérvix presenta de 2-3 anillos y la parte vaginal del cérvix no supera el cm de largo y presenta pliegues radiales, cuya imagen al espéculo recuerda a una evaginación de la mucosa (ectopión) esta no posee tapón mucoso y está cerrado, aunque no consistentemente en la hembra no grávida, teniendo esto un significado adaptativo de la estructura cervical al hecho de que la hembra no grávida presenta celo permanente; la afirmación de algunos autores de que la forma del

cérvix uterino se debe a su adaptación a la forma del glande del pene, en una supuesta analogía con la especie porcina y asumiendo una eyaculación intra cervical, no parece ser muy consistente. **(García, 2005)**

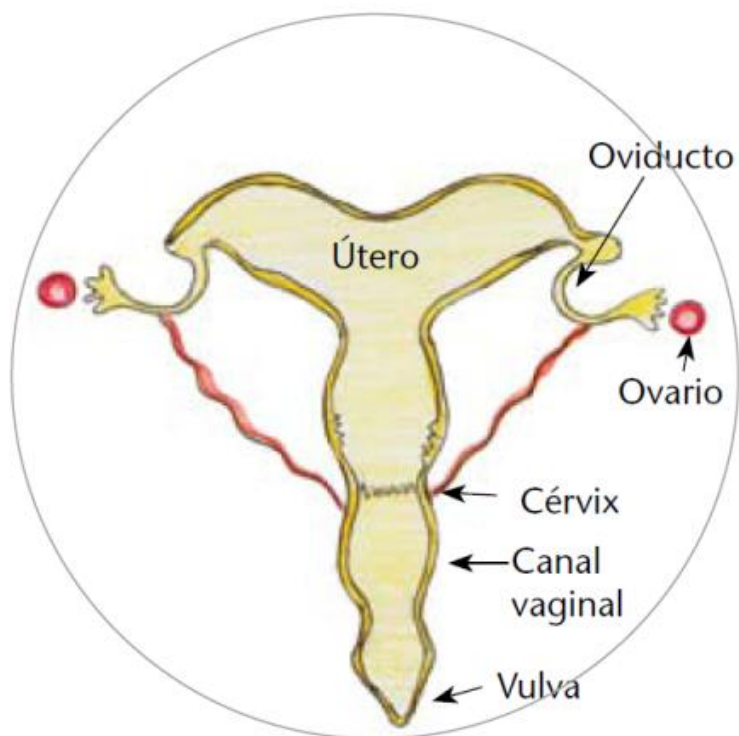
### **1.3.5 Ligamento Ancho o uterino**

El ligamento ancho o ligamento uterino es una formación del mesenterio que mantiene al aparato reproductor en su posición predominantemente pelviana en la hembra no grávida, la parte izquierda del ligamento es ligeramente mayor que la derecha y esta diferencia de tamaño ya se verifica en el recién nacido; dado que la porción izquierda es grande, cuando se produce una contracción del cuerno izquierdo, se genera un pliegue en el ligamento y el ovario se coloca encima de dicho pliegue, el pedículo del ovario es largo y la ubicación del ovario izquierdo no es estable y en esa forma no siempre es fácil de palparlo como el derecho; la bolsa ovárica es mayor que la de los otros animales y está dividida por un septo en dos cámaras la lateral y la medial, la primera corresponde al infundíbulo. **(Frank, 2000)**

### **1.3.6 Vagina**

La vulva da entrada a la vagina, un órgano de forma tubular, a través del cual penetra el pene del macho durante la cópula y sale la cría en el momento del parto; normalmente la vagina 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; si durante la monta se observa que el macho tiene dificultad en penetrar la hembra, puede ser debido a algún defecto anatómico en la vagina, a insuficiente desarrollo de ésta, o a un himen (membrana) robusto y persistente. **(Estudio FAO, 2006)**

**Grafico 1 Estructura del aparato reproductor.**



Fuente.- (Sepúlveda, 2011)

## **1.4 FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LA HEMBRA**

En camélidos, los estudios realizados desde hace más de 50 años han contribuido al conocimiento de la fisiología reproductiva pero aún existen aspectos poco conocidos o que no siempre son considerados en el manejo reproductivo; los avances tecnológicos y el conocimiento de nuevos conceptos son importantes para mejorar los deficientes índices reproductivos reportados en camélidos. **(García, 2005)**

Los camélidos son poliéstricos de ovulación inducida, es decir que no presentan estacionalidad por fotoperiodo; son uníparos (una cría por año) cuya gestación dura aproximadamente en promedio 340 días (11 meses + 10-20 días); se considera que a los 2 años están en condiciones de recibir la primera monta, la hembra recibe el servicio echada de cúbito ventral y la duración de la monta es prolongada. **(Rossi A, 2004)**

### ***a) Deficiencias en la ovulación***

Las investigaciones desarrolladas en permitieron determinar una de las más importantes características en la fisiología reproductiva de los camélidos, la condición de especies de ovulación inducida por lo que requieren de estímulos externos como la copula para que ocurra el evento de la ovulación; las fallas en la ovulación pueden ser un factor importante en las deficiencias reproductivas de los centros de crianza. **(García, 2005)**

Investigaciones desarrolladas permitieron determinar que la ovulación no ocurre únicamente por el estímulo de la copula sino por la presencia de una proteína, denominada Factor de la Hormona Luteinizante (LH) a partir de las células secretoras de la hipófisis, mediante un mecanismo de acción sistémico, recientemente se ha reportado su resistencia al calor y a la acción enzimática. **(Huanca, 2011)**

### ***b) Manipulación de los ciclos foliculares***

La hembra de los camélidos no presenta ciclos estrales como otras especies, pero en ausencia de copula, permanecen en un estado de aceptación al macho hasta por 40 días de receptividad continua, con un corto periodo de rechazo, no mayor a las 48 horas; esta conducta de receptividad está determinada por el crecimiento folicular en forma de ondas, similar a otras especies domésticas, que se superponen; este crecimiento de las ondas foliculares ha sido reportada por diversos autores, con diferencias entre especie, señalándose un intervalo entre ondas de 12 a 16 días en alpacas o de 14 a 21 días en llamas dependiente de la condición de lactante o no lactante de la hembra, los estadios de desarrollo folicular presentan fases denominadas de crecimiento, estático o de regresión; en las condiciones del altiplano, las hembras de los camélidos presentan actividad de receptividad sexual durante los meses de Diciembre a Marzo o Abril, coincidiendo con la época de lluvias y una mayor disponibilidad de pasturas, el corto periodo de servicio sugiere la necesidad de utilizar esquemas de manipulación ovárica, que permitan la sincronización de las ondas foliculares y realizar los servicios con presencia de folículos en fase

de crecimiento o estática que posiblemente puedan ayudar a mejorar la tasa de preñez. (Huanca, 2011)

#### **1.4.1 Ciclo ovárico de la llama**

El ciclo ovárico se divide en dos eventos fisiológicos y que se suceden uno después del otro, la fase folicular y la fase lútea; la actividad folicular de las llamas inicia a los 6 meses, pero son estacionales además la ovulación es inducida por la copula del macho o mediante la administración de hCG; ya que esta no presenta celo y la hembra permanece receptividad al macho con periodos de no aceptación mayores a 48 horas. (Ruiz A, 2011)

### **1.5 OVOGÉNESIS**

Es el desarrollo de los óvulos tiene lugar en las gónadas femeninas: los ovarios; en este órgano, las células madres germinales sufren un complicado proceso en el que se pueden distinguir las siguientes fases. (Flores, 2006)

**1°) Fase de proliferación o multiplicación:** las células madres germinales se multiplican por mitosis dando ovogonias.

**2°) Fase de crecimiento:** las ovogonias atraviesan una fase de crecimiento y se convierten en ovocitos de primer orden (ovocitos I).

**3°) Fase de maduración:** una vez que el ovocito primario ha completado su crecimiento está ya preparando para atravesar las dos divisiones de la meiosis y transformarse en una célula haploide con cromosomas; la ovótida.

Una peculiaridad muy importante de la ovogénesis es que durante la meiosis el ovocito no se divide en cuatro células iguales sino que la mayoría del citoplasma queda en una sola de ellas, la que dará lugar al ovulo. Así, cada ovocito primario da lugar a un único ovulo; las otras tres células restantes, muy pequeñas, se denomina crepúsculos polares y se trata en realidad de gametos

abortivos que permanecen un tiempo adosados al ovulo hasta terminar atrofiarse y desaparecer. **(Felipe, 2006)**

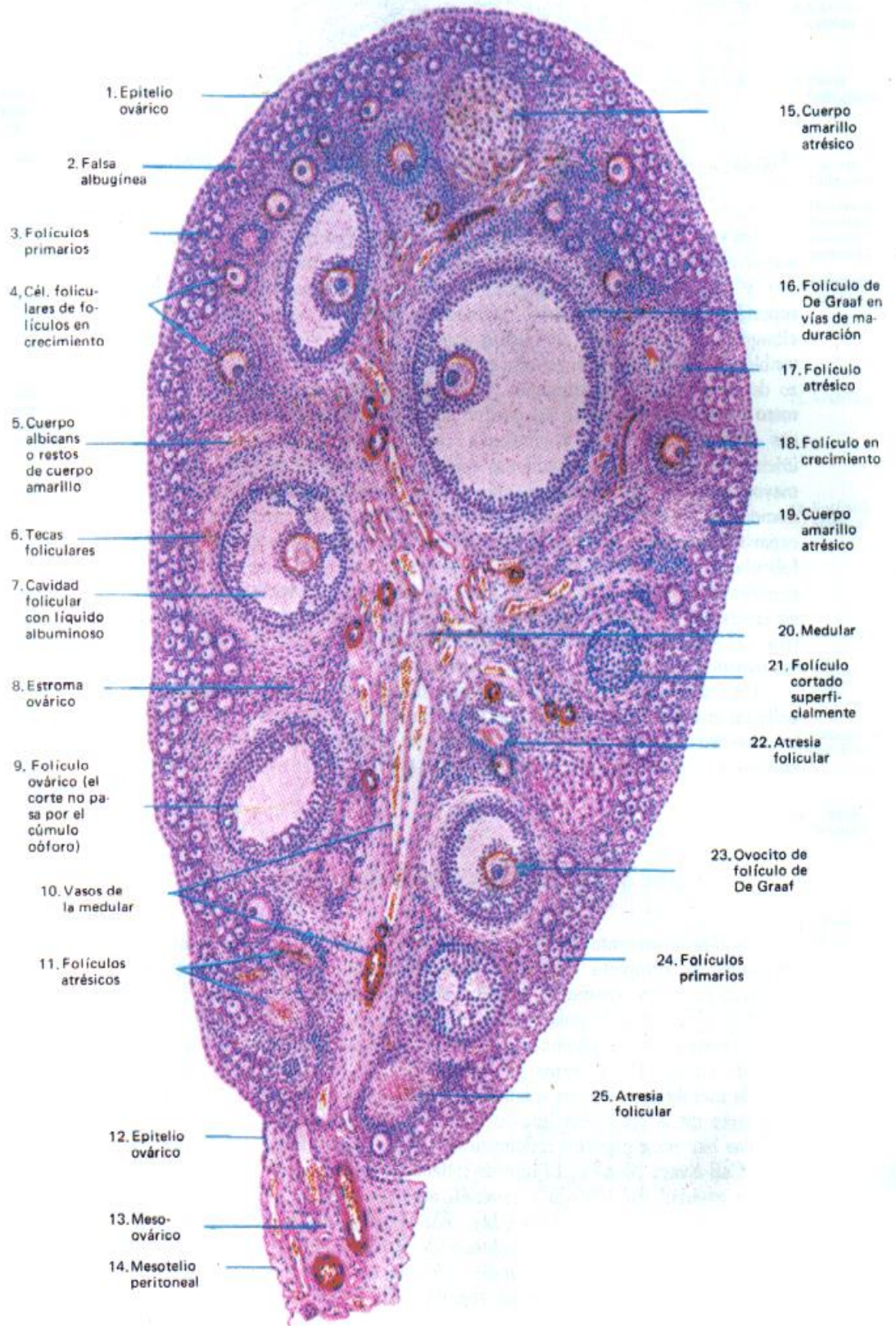
**4°) Fase de diferenciación:** la ovótida se transforma en el óvulo. En general no se trata de una fase de transformaciones tan acusadas como las que suceden en el espermatozoide.

El ovulo es una célula haploide de gran tamaño, pues almacena sustancias nutritivas en forma de granos de vitelo. Como cualquiera otra célula está recubierta por la membrana plasmática. Pero en la mayor parte de los animales existen otras membranas de gran espesor envolviendo a la membrana plasmática. **(Veeck, 2007)**

### **1.5.1 Ovulación**

La ovulación es refleja o inducida y después de la copula con el macho a las 34,2 y 12,8 horas hay un aumento de la hormona luteinizante (LH) 15 minutos después de la copula seguido por un pico a las 2 horas y un retorno a los niveles basales a las 72 horas. **(Rossi A., 2004)**

**Grafico 2 Desarrollo de un folículo ovárico.**



Fuente.- (Fiorel, 2010)

## 1.6 FOLICULOGÉNESIS

El folículo es la unidad estructural y funcional de los ovarios. La foliculogénesis se define como el proceso de formación, crecimiento y diferenciación folicular; abarca desde el estadio de folículo primordial hasta el de folículo preovulatorio. La fase de crecimiento puede durar de 4 a 7 días, la fase de maduración puede durar de 7 a 21 días y la fase de regresión puede durar de 4 a 7 días. (Ruiz B, 2011)

### 1.6.1 Dinámica folicular

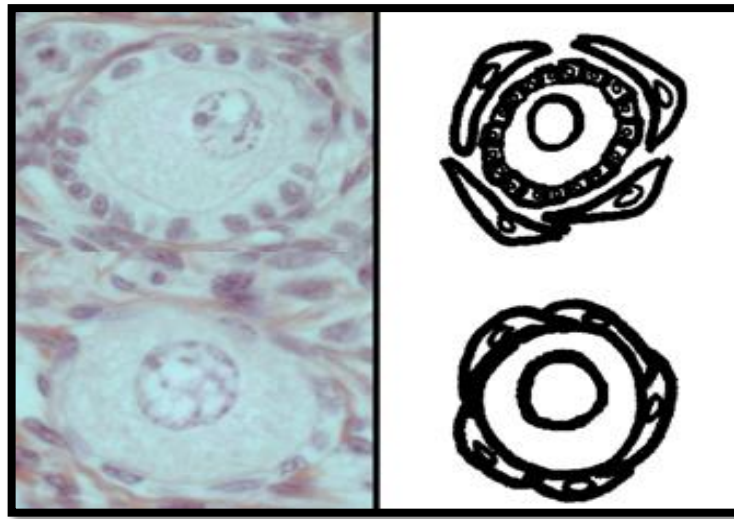
Las llamas no tienen ciclos estrales como otras especies domésticas. Cuando las hembras no son expuestas al macho presentan largos periodos de receptividad y largos periodos de no receptividad (48 a 72) horas esto está relacionado con los niveles plasmáticos estrogénicos, reflejando las ondas sucesivas de maduración y atresia de los folículos ováricos; por lo tanto la tasa de remplazo de folículos dominantes que prevalecen por largos periodos, es probable que asegure niveles ininterrumpidos de estrógenos que facilite una casi continua receptividad al macho. (Gigli, 2006)

### 1.6.2 Fases del desarrollo folicular

Las células pre-granulosas, derivadas del epitelio ovárico, se diferencian en células granulosas, rodeando a los **ovocitos I**.

*a) Folículos primordiales.* Estos se caracterizan histológicamente por el ovocito I detenido en la profase de su primera división meiótica (diploteno) rodeado por una capa plana de células de la granulosa y no es hasta la pubertad bajo la acción de FSH que comienza el desarrollo folicular y termina allí en la corteza ovárica la primera división meiótica; es a partir de esta población estática y durmiente que se origina toda la población de folículos en crecimiento. La mayoría se atresian antes de adquirir las condiciones de folículo preovulatorio. (Palma A, 2007)

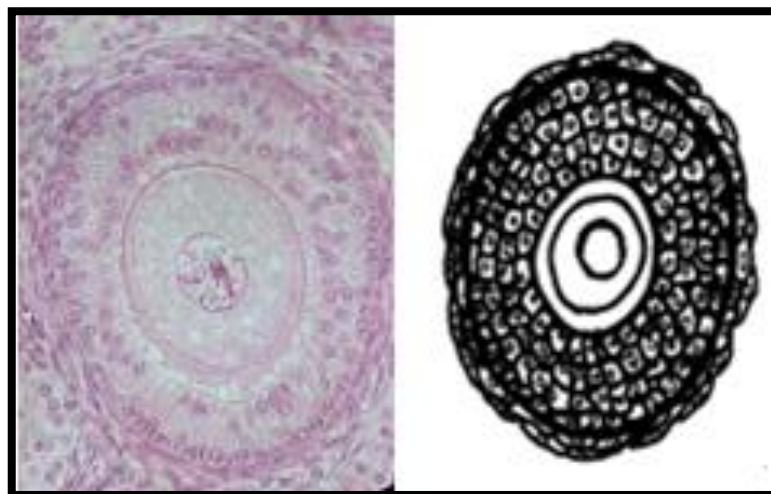
**Grafico 3 Folículo Primordial**



**Fuente.-** (Juarranz, 2012)

**b) Folículo primario.** Las células planas de la granulosa antes de comenzar a dividirse por mitosis se diferencian en una capa de células de forma cúbica que rodea al ovocito I, cuando esto sucede los folículos se clasifican en folículos primarios; en esta etapa el ovocito comienza a rodearse de una capa celular amorfa de glicoproteínas denominada zona pelúcida, las células de la teca interna comienzan a rodear por fuera a las células de la granulosa. (Gigli, 2006)

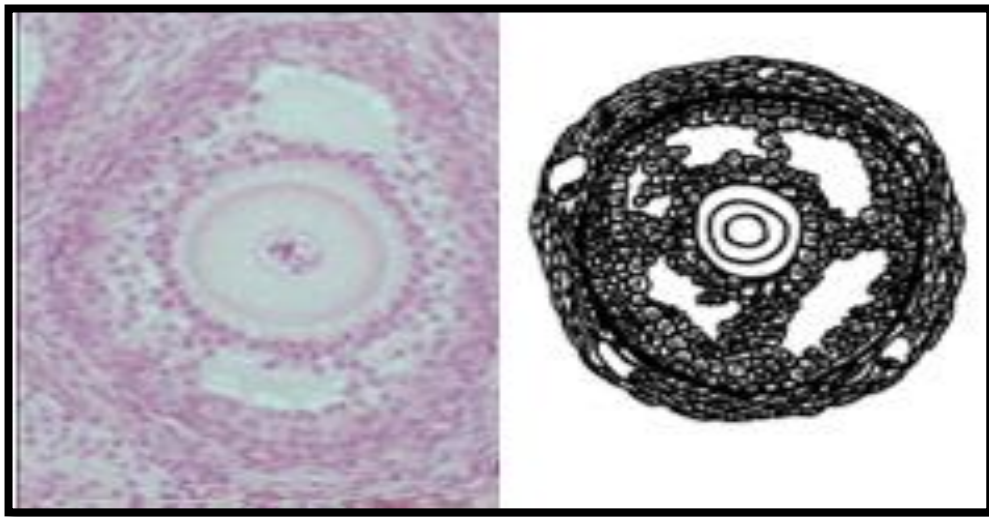
**Grafico 4 Folículo primario**



**Fuente.-** (Juarranz, 2012)

*c) Folículo secundario.* Las células de la granulosa aumentan de tamaño, número y se denomina folículo secundario al ovocito I rodeado por varias capas de células de la granulosa; las células tecales se diferencian en una capa externa y otra interna rodeando por fuera a las células de la granulosa, hasta este estadio los folículos se clasifican en preantrales debido a que aún no se ha formado la cavidad antral. **(Gigli, 2006)**

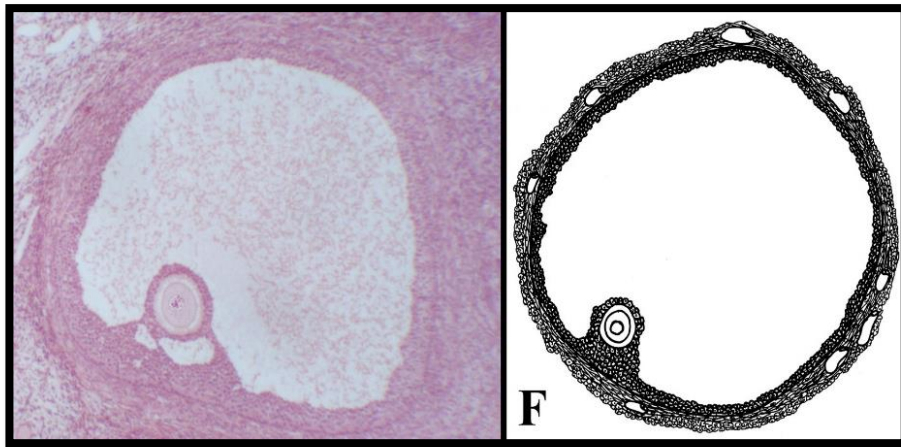
**Grafico 5 Folículo Secundario**



**Fuente.-** (Juarranz, 2012)

*d) Folículos terciarios o folículos antrales.-* se caracterizan histológicamente por la presencia de la cavidad antral y por estar rodeados de varias capas cúbicas de células de la granulosa que comienzan a secretar un trasudado que se denomina líquido folicular, que al acumularse produce un reordenamiento de las mismas en células del cúmulo y murales, los folículos terciarios se clasifican en dominantes y subordinados. **(Gigli, 2006)**

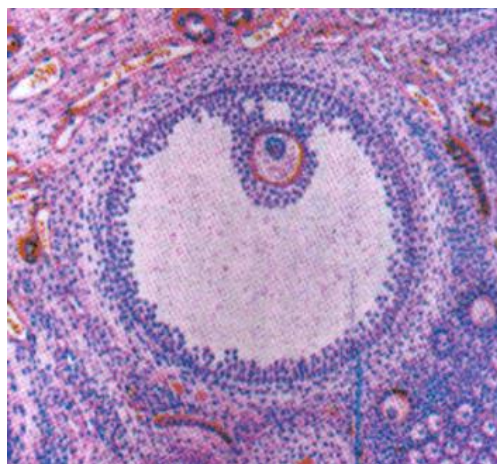
### Grafico 6 Folículos Terceario



Fuente.- (Juarranz, 2012)

e) *Folículos preovulatorios o folículos De Graaf*. Tienen la capacidad de responder al estímulo de la LH produciendo cambios morfológicos y bioquímicos que finalizarán reiniciando la meiosis y desencadenando la ovulación; la segunda división meiótica comienza inmediatamente después de la ovulación, pero se detiene en metafase II y no se completa hasta tanto no penetre el espermatozoide. (Gigli, 2006)

### Grafico 7 Folículo de Graaf



Fuente.- (Juarranz, 2012)

## **1.7 DINÁMICA FOLICULAR OVÁRICA**

En camélidos sudamericanos, también se describen onda foliculares pero de naturaleza anovulatoria, es decir, no llegan a ovular mientras las hembras se encuentran en ausencia de machos a su alrededor; por tanto, las ondas foliculares continúan desarrollándose en forma continua, existiendo siempre la presencia de un folículo dominante, la duración de la onda folicular en alpacas varía entre 12 a 16 días, con presencia de folículos dominantes que alcanza los 8.8 mm (Vásquez, 2010)

## **1.8 LUTEINIZACIÓN Y LUTEÓLISIS**

En camélidos sudamericanos, el cuerpo lúteo ya se encuentra desarrollado a las 48 horas de la ovulación (3 días post cópula) y se mantiene durante 8 a 9 días, en el caso de no ocurrir la fecundación, la destrucción del cuerpo lúteo o luteólisis ocurre entre los días 10 a 12 post cópula, el agente responsable de desencadenar la luteólisis en alpacas tanto en forma natural como artificial es la  $PGF2\alpha$ . (Vásquez, 2010)

## **1.9 METODOS DE RECUPERACION DE OVOCITOS**

### **1.9.1 Punción folicular trans-vaginal y recuperación de ovocitos.**

La técnica de OPU fue desarrollada con el fin de obtener repetidamente ovocitos de alto material genético; este se compone de tres partes un ecógrafo con un transductor sectorial (sonda), una bomba de aspiración y un sistema de guía de la aguja, conectado a un recipiente de recolección de ovocitos. Cualquier ecógrafo capaz de que use sonda lineal, que transmite ondas de sonido paralelas para dar una imagen plana, o una sonda sectorial que presenta una imagen segmentada de la estructura investigada; en ambos tipos, la frecuencia de las ondas de sonido transmitidas puede ser alterada: cuanto más

alta la frecuencia, más superficiales con las ondas que penetran el tejido y más definidas son las imágenes. Al animal se lo puede sedar logrando una relajación adicional de los intestinos, las heces deben ser removidas del recto durante la palpación y posteriormente se realiza la anestesia epidural con lidocaína al 2% para evitar el movimiento del recto durante el procedimiento. La vulva y el periné deberá ser limpiados y desinfectados antes que el dispositivo de OPU, que contiene el transductor sectorial y el sistema de guía de la aguja, sean introducidos en la vagina. El dispositivo tiene un mango mediante el cual puede ser manipulado con una mano fuera del animal. La cabeza del transductor es fijada en posición cráneo dorsal, a la izquierda o derecha de la abertura externa del cérvix, dependiendo del ovario que será puncionado; introduciendo la mano en el recto, el operador fija el ovario para fijarlo contra la cabeza del transductor, de esa forma el ovario y sus folículos pueden ser visualizados en la pantalla del ecógrafo; debido a que el sistema de guía de la aguja está ubicado cerca del transductor, la aguja se visualiza en el sector escaneado, pudiendo puncionarse los folículos cuyo contenido es aspirado mientras se colapsan. La línea de punción, que indica donde debe ser ubicado el folículo para una punción exitosa, está programada en el software que controla las imágenes ecográficas y puede ser visualizada en la pantalla. El operador mueve la aguja lentamente hacia craneal hasta que la pared vaginal es atravesada y esta penetra el folículo, la aguja está conectada a la bomba de vacío que aspira el contenido del folículo; el líquido folicular y el ovocito son recolectados en un recipiente que contiene medio de recolección y heparina. Los ovocitos se identifican utilizando una lupa estereoscopia y por medio de una pipeta son colocados en un medio de maduración. (Palma, 2001)

### **1.9.2 Slicing folicular**

Los ovarios son transportados en solución fisiológica al 0,9%, a una temperatura entre 30 – 35°C, hasta el laboratorio. Alrededor de 2 horas post-recolección de los ovarios, se lavan por tres veces en solución fisiológica al 0,9%. Los ovarios se fijaron a una pinza hemostática curva para con un bisturí seccionar longitudinal y transversalmente cada folículo de 2 – 8 mm de

diámetro visibles en la superficie del ovario, y luego se sumerge para lavarse con una suave presión cada área seccionado en un medio de lavado entre 5 – 10 ml en una placa de Petri graduado y protegido de la luz. (Gomez, 2012)

### **1.9.3 Aspiración folicular post-mortem**

Los ovarios fueron colocados en solución fisiológica al 0,9% a 30-35°C, al que se agrega penicilina G potásica, la cual se puede transportar por 4 horas al laboratorio; se procedió a lavar los ovarios con solución fisiológica al 0,9% a 30-35°C y retirar los restos de tejido. Para luego aspirar los folículos visibles utilizando una jeringa de 10ml con una aguja de 21G x 1 1/2 pulgadas para luego colocarlas en un medio de lavado entre 5-10ml en una placa Petri graduada. (Gómez O, 2013)

### **1.9.4 Disección-ruptura folicular**

Se inicia diseccionando folículos de 2 a 6mm hasta aislar la integridad del folículo ovárico, luego se procede a realizar ruptura de la membrana del folículo en una placa Petri graduada, utilizando un bisturí delgado, se lleva la muestra a una lupa estereoscopia para identificar los ovocitos. (Gómez O, 2013)

## **1.10 MADURACIÓN DE OVOCITOS IN VITRO**

Los complejo de ovocitos cumulus (COC's) recuperados requieren de un proceso de maduración artificial en el laboratorio; la maduración *in vitro* simula el tiempo transcurrido y sobretodo los procesos metabólicos que en forma natural ocurre en el ovocito contenido en el folículo dominante, entre el pico preovulatorio de LH hasta que se produce la ovulación, en este proceso se reactiva la división mítica desde el estado de diploteno de la profase I de la primera división hasta alcanzar la metafase II de la segunda división meiótica, que ocurre en forma natural. (Ruiz A, 2011)

Para la maduración *in vitro* de ovocitos, se utilizan medios de cultivo clasificados en medios simples y medios complejos; un *medio simple* es aquel que contiene una solución salina fisiológica BUFFERADA usualmente con bicarbonato y adicionado de piruvato, lactato y glucosa, un *medio de maduración complejo* contiene, además de los constituyentes de un medio simple, aminoácidos, vitaminas, purinas y otras sustancias encontradas asociadas al suero. En bovinos el medio tradicional y exitosamente usado es el Tissue Culture Medium 199 (TCM-199), medio complejo, compuesto por sales Earle´s con HEPES y bicarbonato, como estabilizantes de pH y suplemento con piruvato, lactato, vitaminas, aminoácidos, purinas y proteínas como suero fetal bovino o albumina sérica bovina. En camélidos se utiliza principalmente medios de maduración similares a los utilizados en bovinos. **(Chávez, 2003)**

Los COCs de llamas fueron madurados *in vitro* utilizando un tiempo de 36 horas de maduración en medio TCM-199 suplementando con suero fetal bovino, piruvato de Na, FSH, estradiol y sulfato de gentamicina, obtuvieron 62% de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II. **(Ruíz B, 2011)**

## **1.11 EVALUACIÓN Y CALIFICACIÓN DE OVOCITOS**

Se basa en el aspecto del complejo ovocito cumulus que rodea al ovocito; se acepta que los ovocitos metafase II de buena morfología deben de tener un citoplasma nítido y moderadamente granuloso, un espacio perivitelino pequeño, un corpúsculo polar intacto y una zona pelúcida clara. **(Palma A, 2007)**

Las anomalías extra citoplasmáticas incluyen irregularidades en la forma de los ovocitos, ampliación del espacio perivitelino, fragmentación del primer corpúsculo polar y consistencia anormal de la zona pelúcida.

La evaluación morfológica se lleva a cabo en una lupa de 40 aumentos aproximadamente y se toma en cuenta el aspecto del cumulus y del ovocito. **(Palma A.G. 2001)**

## 1.12 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL OVOCITO

**1.1.1 Corpúsculo polar:** la presencia de un corpúsculo polar dismórfico, aunque no afecte a la tasa de fecundación, sí afecta al posterior desarrollo del embrión.

**1.1.2 Espacio perivitelino:** un espacio perivitelino agrandado, irregular, con contenido en su interior, disminuye la tasa de preñez, aunque no afecte a la tasa de fecundación.

**1.1.3 Zona pelúcida:** la existencia de una zona pelúcida engrosada, adelgazada, irregular o cerrada o con diferente densidad, afecta a la tasa de ovocitos que no continúan su desarrollo.

**1.1.4 Citoplasma:** la presencia de anomalías del citoplasma como granulaciones, inclusiones, cuerpos retráctiles, vacuolas, etc., se ha demostrado que disminuye la tasa de preñez. (Veeck, 2011)

**Tabla 1 Clasificación de ovocitos**

Clasificación	Criterios
1	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cumulus con capas múltiples</li><li>• Cumulus compacto</li><li>• La totalidad el COC es clara y transparente</li><li>• Citoplasma homogéneo</li><li>• Cumulus como 1 o algo más oscuras y menos transparente.</li></ul>
2	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ooplasma con granulación más gruesa y más oscura que en 1 en la periferia.</li><li>• Cumulus menos compactos, más oscuros que en 1 o 2</li></ul>
3	<ul style="list-style-type: none"><li>• Con manchas oscuras</li></ul>
4	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cumulus expandidos</li></ul>

Fuente.- (Palma A.G. 2001)

**Tabla 2 Calificación de ovocitos**

Calificación	Criterios
<b>Buena</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cumulus con capas múltiples, compacto pero translucido</li><li>• Ooplasmas con granulación fina, densa y uniforme</li><li>• Cumulus ligeramente expandido, con menor número de capas que pueden cubrir la mitad de la zona pelúcida, granulaciones ligeramente más gruesas.</li></ul>
<b>Regular</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cumulus parcialmente expandido y disperso</li><li>• Red de uniones son presencia de células del cumulus</li><li>• Ovocitos pequeños o grandes, ovocitos desnudos</li></ul>
<b>Mala</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cumulus muy oscuro (marrón oscuro, negro)</li><li>• Ooplasmas de color muy claro o negro</li><li>• Ooplasmas bueno con áreas muy claras muy oscuras</li></ul>

Fuente.- (Palma A.G. 2001)

**Grafico 8 Proceso de maduración in vitro de los ovocitos**

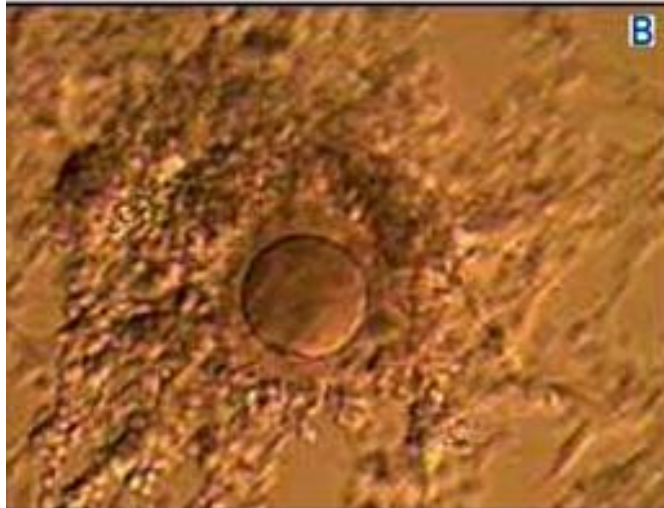
A) Complejo cumulus ovocito.



Fuente.- (Vargas L. 2012)

**Grafico 9 Proceso de maduración in vitro de los ovocitos a las 36 Horas.**

B) Complejo cumulus ovocito 36 horas después de ser cultivado en medio de maduración.



**Fuente.-** (Vargas L. 2012)

**Grafico 10 Proceso de maduración in vitro del ovocito en Metafase II**

C) Ovocito desnudo mostrando segundo cuerpo polar (metafase II).



**Fuente.-** (Vargas L. 2012)

## 1.13 CRIOCONSERVACIÓN

La criopreservación es el proceso en el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (el punto de ebullición del nitrógeno líquido) para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y poderlo mantener en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo. A esas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producirían la muerte de una célula, quedan efectivamente detenidas. **(Ruiz B, 2011)**

La congelación de células vivas es un proceso fisicoquímico complejo de transporte de calor y agua entre célula y el medio que lo rodea. Tanto la criopreservación de ovocitos como la del embrión se llevan a cabo mediante la exposición de ambos a temperaturas muy bajas. Con el enfriamiento se produce una disminución notable del metabolismo y ahorro energético, que son factores necesarios para la prolongación de la vida celular. **(Ruiz A, 2011)**

El punto de congelación de la solución es inversamente proporcional a la concentración de solutos presentes. Cuando la suspensión celular es enfriada y alcanza una temperatura entre  $-5$  y  $-10^{\circ}\text{C}$  se forman núcleos de hielo distribuidos aleatoriamente en el medio extracelular que dará lugar a regiones en fase cristalina. El hielo en el espacio extracelular coexiste con el agua líquida intracelular gracias a la membrana plástica que constituye la barrera que detiene el crecimiento de cristales dentro de la célula. Cuando en el medio extracelular ocurre la cristalización se forma hielo puro dejando los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida, a medida que el cambio de fase progresa. Así, las células en suspensión deben deshidratarse para mantener el equilibrio osmótico con un medio extracelular cada vez más hipertónico. **(Cobo, 2008)**

Existe una tasa de congelación óptima para cada tipo de célula debido a las diferencias de permeabilidad del agua, el coeficiente de temperatura de dicha

permeabilidad y su relación superficie-volumen. Con una velocidad de enfriamiento adecuada, la célula se deshidrata y concentra intracelularmente antes de alcanzar la cristalización, de tal forma que la posibilidad de congelación intracelular y consecuentemente de daño celular se minimiza. **(Fertilab, 2011)**

## **1.14 VITRIFICACIÓN**

La vitrificación es el proceso de conversión de un material en un sólido amorfo similar al vidrio, carente de toda estructura cristalina. **(Cando 2005)**

Esto se consigue por medio de calentamiento o enfriamiento muy rápido o mediante la mezcla con un aditivo; el proceso debe ser lo más rápido o instantáneo posible, por ese motivo se emplea el sistema denominado criotop **(Ruiz JE. 2013)**.

Se utiliza ampliamente como técnica de crioconservación de embriones y ovocitos la vitrificación se consigue mediante un enfriamiento muy rápido en el cual se utiliza una solución altamente concentrada que no cristaliza durante la congelación, en tanto que su viscosidad aumenta con el descenso de temperatura hasta la formación de un estado sólido amorfo. Para conseguir un gran cambio de temperatura a gran velocidad, se usa un volumen mínimo de medio (menos de 0,1 micro litros) y nitrógeno líquido a -196°C. **(Ruiz A, 2011)**

La exposición y las tasas de congelación deben ser lo suficientemente rápidas para evitar la toxicidad y la formación de cristales intracelulares que puedan dañar el contenido celular; para conseguir que la deshidratación sea muy rápida se utilizan crioprotectores en concentraciones elevadas, la velocidad de congelación/ descongelación es indirectamente proporcional a la concentración de crioprotectores. **(Ruiz JE. 2013)**.

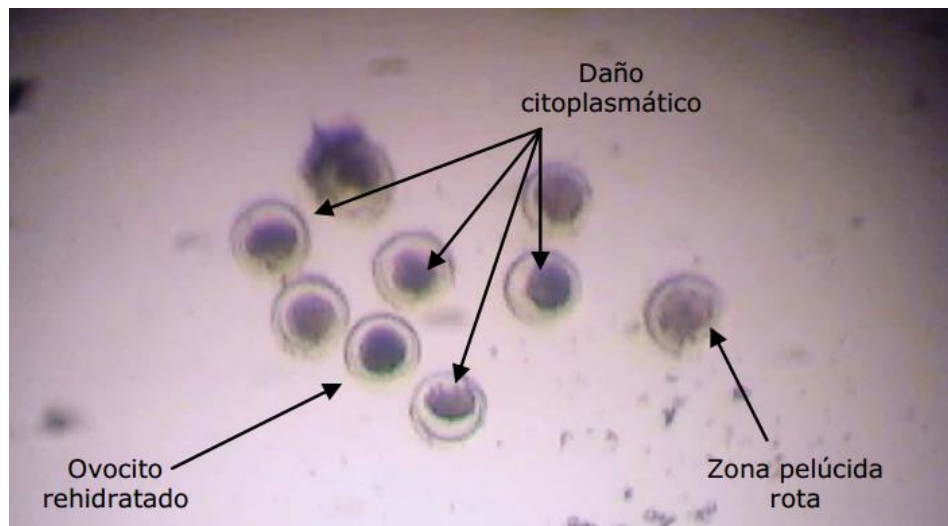
Antes de la congelación, el material biológico debe equilibrarse con la solución crioprotectora (en menor concentración) para que pueda soportar el choque

osmótico. La tasa de supervivencia de las muestras es mayor del 90%, y los embriones/ovocitos suelen sobrevivir intactos. (Palma A. 2001)

## 1.15 DESCONGELACIÓN DE OVOCITOS

Para descongelar los ovocitos, las micro gotas vitrificadas se retiraron del vial criogénico y se expusieron a una solución de 2 ml de TRE 0,3 M en SB por 5 minutos sobre una platina temperada a 39 °C y luego los ovocitos se transfirieron a SB por un tiempo no menor de 2 minutos; los ovocitos se lavaron tres veces en mSOF-Hepes y se colocaron en medio de maduración fresco por 30 minutos, de este modo, desde el descongelamiento hasta la activación química transcurrieron aproximadamente 50-60 minutos; basado en una evaluación morfológica los ovocitos sobrevivientes a la criopreservación se seleccionaron de acuerdo a la integridad de la zona pelúcida y presencia de un ooplasma homogéneo, los ovocitos dañados por la solución de vitrificación son descartados. (Ruiz J, 2010)

**Grafico 11 Ovocitos vitrificados descongelados**



**Fuente.-** (Veracruz H, 2006)

La descongelación de ovocitos vitrificados se lo realiza elevando la pajilla a temperatura ambiente durante 5seg, sumergiéndola posteriormente en el medio de desvitrificación a 37°C durante 45 seg y después el crioprotector es removido pasando el ovocito por soluciones con diferentes concentraciones de sacarosa de 0.25 y 0.15 M. **(Veracruz H, 2006)**

## **CAPITULO II**

### **2. MATERIALES Y MÉTODOS.**

En el presente capítulo se describe la ubicación geográfica en donde se realizó el estudio, los materiales y equipos utilizados para su desarrollo, los métodos y técnicas aplicadas.

#### **2.1 Características del área de experimento.**

##### **2.1.1 Ubicación del área de estudio.**

**Provincia:** Cotopaxi

**Cantón:** Latacunga

**Parroquia:** Eloy Alfaro

**Sector:** Salache Bajo

##### **2.1.2 Situación geográfica**

**Longitud:** 78°37'19.16"E

**Latitud:** 00°59'47.68" N

##### **2.1.3 Coordenadas cuadrícula mercator utm.**

**N:** 9888.749,37.

**E:** 764.660,386.

##### **2.1.4 Condición climatológica**

**Temperatura:** 14.5°C Promedio

## **2.2 Unidad experimental.**

### **2.2.1 Muestra.**

En el experimento se utilizaron 6 ovarios obtenidos pos mortem de llamas las cuales se adquirió del camal de la ciudad de Riobamba estas fueron llamas de descarte que estaban preparadas para el faenamamiento.

### **2.2.2 Materiales.**

Para el desarrollo de la presente investigación se emplearon los siguientes materiales e insumos de laboratorio.

#### **2.2.2.1 Materiales de Campo.**

- Botas
- Overol
- Guantes de manejo
- Toallas de papel
- Guantes para chequeo ginecológico.
- Ecógrafo Imago
- Gel ecográfico
- Termo de transporte
- Jeringas de insulina
- Jeringas de 3ml
- FOLLTROPIN – V ( 20ml )

#### **2.2.2.2 Materiales de oficina.**

- Computadora
- Calculadora
- Flash memory.
- Impresora.
- Hojas de papel bond.
- Cámara fotográfica.

- Esferográfico.
- Cuaderno.

### **2.2.2.3 SUSTANCIAS Y REACTIVOS**

#### **2.2.2.3.1 Materiales para el transporte de ovocitos**

- Cloruro de sodio a 37° C
- Gentamicina 280mg

#### **2.2.2.3.2 Materiales para crioconservación**

- Medio HOLDING plus (vigo 50ml)
- Medios de vitrificación (V1 – V2 – V3)
- Medios de solución des-vitrificación (SDV1 – SDV2 )
- Nitrógeno Líquido
- Caja de espuma Flex
- Papel aluminio
- Viales de laboratorio
- Tubos falcón
- Tanque de nitrógeno líquido

#### **2.2.2.3.3 Materiales de laboratorio**

- Agujas descartables número 18 x ½”
- Micro pipeta de 20 micro litros
- Lupa Estéreo microscópica luz transmitida.
- Cajas Petri
- Jeringuillas de 20ml

## **2.3 Métodos y Técnicas**

### **2.3.1 Método estadístico**

Los métodos que fueron utilizados son los siguientes.

#### **2.3.1.1 Inductivo**

Ya que busca una solución a un problema donde se obtuvo resultados para poder despejar las hipótesis planteadas y llegar a conclusiones para determinar si es o no efectiva la crioconservación de ovocitos en llamas.

### 2.3.1.2 Deductivo.

Es el que aspira a demostrar en forma interpretativa, mediante la lógica pura, la conclusión en su totalidad, de manera que se garantiza la veracidad de las conclusiones poder llegar a establecer los diferentes resultados y recomendaciones.

Se utilizó este método porque se requiere recolectar, enumerar y analizar la información que se obtuvo durante la investigación.

**Tabla 3 Ovocitos recuperados de llamas**

OVOCITOS LLAMAS	INDICADORES
<b>Ovarios.</b>	(#)
<b>Ovocitos en metafase II</b>	(#)
<b>Ovocitos vitrificados</b>	(#)
<b>Ovocitos descongelados</b>	(#)
<b>Viabilidad de los ovocitos vitrificados.</b>	(%)
<b>Total de ovocitos</b>	(#)

Fuente: directa

Elaborado por: Sánchez Jennifer.

**Tabla 4 Grados de ovocitos recuperados**

OVOCITOS LLAMAS	INDICADORES
<b>Ovocito grado 1</b>	(#)
<b>Ovocito grado 2</b>	(#)
<b>Ovocito grado 3</b>	(#)

Fuente: directa

Elaborado por: Sánchez Jennifer.

### 2.3.3. Variables evaluadas.

#### a. Ovarios y ovocitos.

Estos serán por números se observó la cantidad de ovocitos recuperados, Ovocitos maduros, Ovocitos vitrificados, Morfología de los ovocitos.

Así como el porcentaje de viabilidad esta se evaluó utilizando la siguiente formula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{5\% de ovocitos crio conservados}}{\text{Post descongelación}} \times 100$$
$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Ovocitos viables}}{\text{Ovocitos viables}} \times 100$$

$$\% \text{ Viabilidad} = 0,8 / 16 * 100 = 5\%$$

Para poder observar la viabilidad de los ovocitos crio conservados se descongelo el 5% de ovocitos vitrificados del total de la muestra 0,8 es decir un ovocito para desvitrificar, y para poder obtener el porcentaje de viabilidad se toma en cuenta el 5% de ovocitos vitrificados (0,8) sobre ovocitos viables (16) por cien dando un resultado del 5% de viabilidad de 5% de la muestra es decir que el total de viabilidad de toda la muestra es del 100%.

## 2.4 Manejo del experimento.

Para la presente investigación, se trabajó con 6 ovario obtenidos pos mortem de llamas las cuales se adquirió del camal de la ciudad de Riobamba estas fueron llamas de descarte que estaban preparadas para el faenamamiento; junto con la ayuda de la asociación INTIÑAN.

Estas llamas fueron súper ovuladas para una mejor obtención de ovocitos; se realizó con FOLLTROPIN – V que es una hormona folículo estimulante (FSH); se aplicó durante cuatro días seguidos cada 12 horas por vía intramuscular con dosis de:

**Tabla 5 Dosis para súper ovulación en llamas**

DÍAS	MAÑANA	TARDE
1	1.35ml	1.35ml
2	0.75ml	0.75ml
3	0.55ml	0.55ml
4	0.55ml	0.55ml

Fuente: directa

**Elaborado por:** Sánchez Jennifer, Pino Edwin.

Después de realizado esto esperamos 7 días para efectuar un control por ecografía para verificar si fue efectiva la aplicación hormonal e iniciar con el faenamiento de las llamas.

Los ovarios obtenidos después del faenamiento se transportaron en cloruro de sodio a una temperatura de 37°C más gentamicina de 280mg se colocó en un termo para mantener la temperatura hasta el momento de llegar al laboratorio.

Una vez en el laboratorio se inicia higienizando los ovarios con una solución fisiológica; colocado en la caja Petri.

Para luego realizar punciones en el ovario para extraer líquido folicular y slicing folicular junto con los ovocitos este resultante obtenido se colocó en la caja Petri y fue llevado a la Lupa Estéreo microscópica de luz transmitida; donde se seleccionaron los ovocitos; con la ayuda de una micro pipeta de 20 micro litros se absorbió a los ovocitos los cuales se ubicaron en solución fisiológica por un tiempo muy corto para lavarlos y desechar impurezas.

Se inicia la vitrificación colocando los ovocitos en el medio HOLDING plus donde pasan 20 minutos; este medio capacita a los ovocitos y también contiene antibiótico. Una vez que paso este tiempo los ovocitos son trasladados a otro medio llamado medio de vitrificación 1, denominado SV1 en este pasan los ovocitos por 5 minutos, transcurrido este tiempo se pasan al medio de vitrificación denominado SV 2 durante 3 minutos, para inmediatamente pasar a

una caja de espuma Flex colocada con nitrógeno líquido y encima una plancha de papel aluminio; aquí se colocó las micro gotas para las vitrificación que fueron almacenadas en viales de laboratorio, este vial se colocó en el tubo falcón y llevados al tanque de nitrógeno líquido.

Para la desvitrificación de los ovocitos, donde se consideró el 5% de los ovocitos vitrificados que al realizar los cálculos nos da 0,8 ovocitos por desvitrificar, las micro gotas vitrificadas se retiraron del vial almacenado y se expusieron en un porta objetos atemperado para colocar la solución des-Vitrificante 1 (SDV1) durante 3 minutos, luego se pasó a la solución (SDV2) en esta estuvo durante 5 minutos.

Basado en una evaluación morfológica el ovocito sometido a la criopreservación se calificó de acuerdo a la integridad de la zona pelúcida y el citoplasma.

## CAPITULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente capítulo muestra y expone los resultados obtenidos acerca de los ovocitos de llamas (*Lama glama*) que fueron criados y conservados realizados en el Laboratorio de la Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi donde dichos resultados se ajustan a datos en estudios a nivel internacional.

#### 3.1 Total de ovocitos analizados en el laboratorio.

##### Tabla 6 Total de Ovocitos

El cuadro muestra el total de ovocitos encontrados en cada uno de los ejemplares (Camélido sudamericano Llama), los ovocitos y vitrificados así como también la calificación de los ovocitos los cuales se basa en el aspecto del complejo ovocito cumulus que rodea al ovocito podemos encontrar un cumulus con capas múltiples, compacto pero translucido además de un Ooplasmas con granulación fina, densa y uniforme y Cumulus ligeramente expandido, con menor número de capas que pueden cubrir la mitad de la zona pelúcida, granulaciones ligeramente más gruesas. (Palma A.G. 2001).

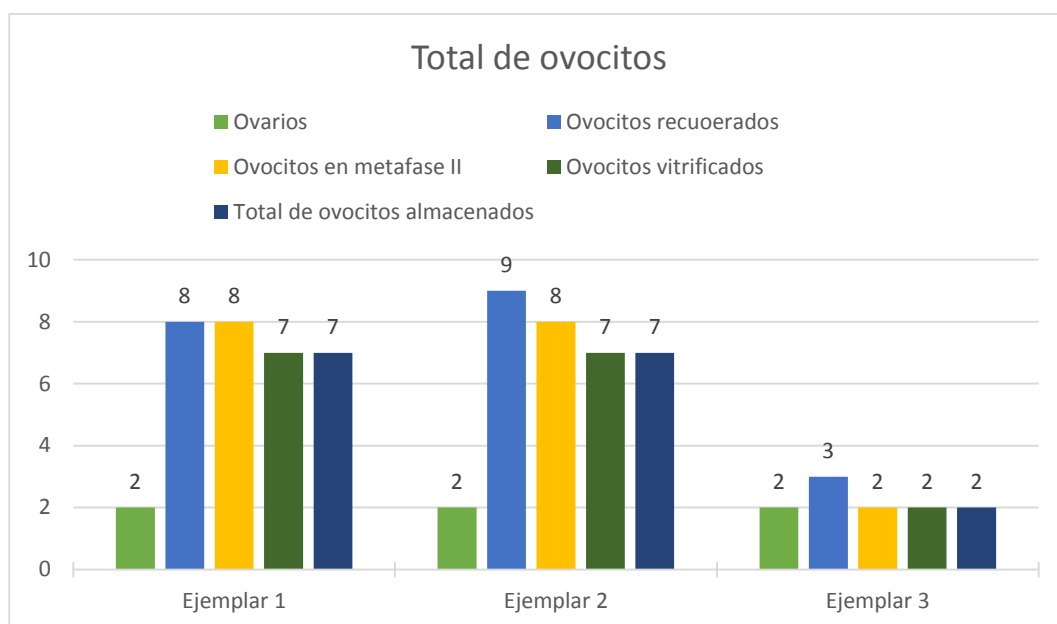
Especie	Ejemplar 1	Calificación	Ejemplar 2	Calificación	Ejemplar 3	Calificación
<b>Ovarios</b>	2		2		2	
<b>Ovocitos recuperados</b>	8		9		3	
<b>Ovocitos en metafase II</b>	8	Buena	8	Buena	2	Buena
<b>Ovocitos Vitrificados</b>	7		7		2	
<b>Total de ovocitos almacenados</b>	7		7		2	

Fuente: directa

Elaborado por: Sánchez Jennifer.

### Grafico 12 Total de ovocitos

Representación gráfica del total de la muestra de ovocitos encontrados en cada uno de los ovarios de los ejemplares (Camélido sudamericano Llama), donde se evidencia que en los en los 6 ovarios se pudo encontrar 20 ovocitos de los cuales 18 se encontraban en metafase II con todas sus estructuras bien definidas zona pelúcida intacta y un citoplasma homogéneo (**Vargas L. 2012**) y 16 ovocitos vitrificados con características ideales como las ya mencionadas.



**Fuente:** directa

**Elaborado por:** Sánchez Jennifer.

### **Tabla 7 Calificación de ovocitos recuperados**

En el cuadro se puede observar el total de ovocitos encontrados, así como la calificación en grados de los mismos, donde 17 ovocitos se encuentran en grado uno ya que encontramos un cumulus con capas múltiples, cumulus compacto, la totalidad el COC es clara y transparente un citoplasma homogéneo y un cumulus como 1 o algo más oscuras y menos transparente; así como 2 ovocitos en grado dos ya que encontramos un ooplasma con granulación más gruesa y más oscura que en 1 en la periferia y cumulus menos compactos, más oscuros que en 1 o 2 además de un ovocito grado uno ya que estaba con cumulus expandidos. (Palma A.G. 2001)

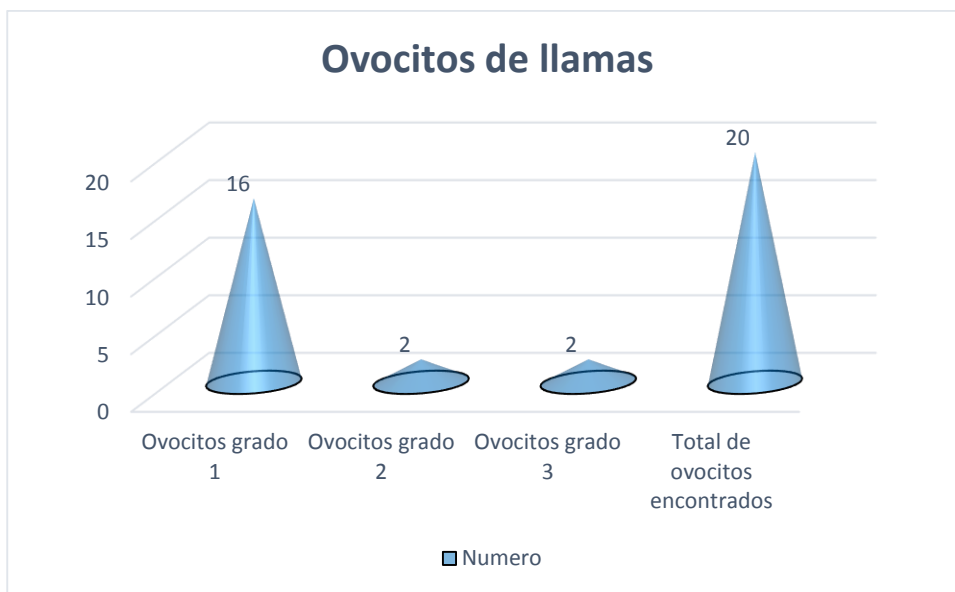
OVOCITOS LLAMAS	INDICADORES
<b>Ovocito grado 1</b>	17
<b>Ovocito grado 2</b>	2
<b>Ovocito grado 3</b>	1
<b>Total de ovocitos encontrados</b>	20

Fuente: directa

Elaborado por: Sánchez Jennifer.

### **Grafico 13 Calificación de ovocitos recuperados**

Representación gráfica de la clasificación en grados de los ovocitos y total de ovocitos en el cual se puede observar el total de ovocitos encontrados, así como la calificación en grados de los mismos, donde 17 ovocitos se encuentran en grado uno ya que encontramos un cumulus con capas múltiples, cumulus compacto, la totalidad el COC es clara y transparente un citoplasma homogéneo y un cumulus como 1 o algo más oscuras y menos transparente; así como 2 ovocitos en grado dos ya que encontramos un ooplasma con granulación más gruesa y más oscura que en 1 en la periferia y cumulus menos compactos, más oscuros que en 1 o 2 además de un ovocito grado uno ya que estaba con cumulus expandidos. (Palma A.G. 2001)



**Fuente:** directa

**Elaborado por:** Sánchez Jennifer.

**Tabla 8 Viabilidad de ovocitos**

En el cuadro se puede observar el porcentaje de viabilidad tomado en cuenta el 5% del total de la muestra de ovocitos post descongelación en el cual se pudo observar que no hubo daño en las estructuras un citoplasma homogéneo y zona pelúcida intacta sin alteraciones.

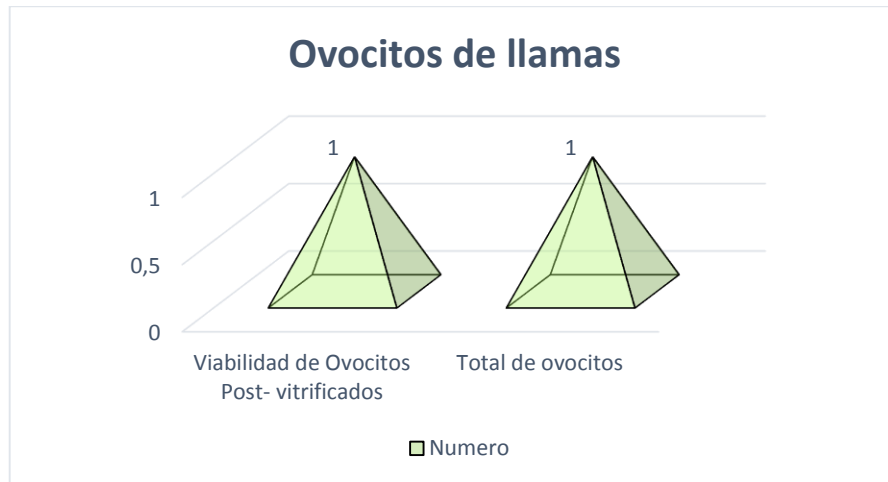
Ovocito Desvitrificado	<b>1</b>
Total de ovocitos	<b>1</b>
% de viabilidad de los ovocitos Desvitrificación	<b>5%</b>

**Fuente:** Directa

**Elaborado por:** Sánchez Jennifer.

### Grafico 14 Viabilidad

Representación gráfica del porcentaje de viabilidad del 5% del total de la muestra de ovocitos post descongelación en el cual se pudo observar que no hubo daño en las estructuras un citoplasma homogéneo y zona pelúcida intacta sin alteraciones.



Fuente: directa

Elaborado por: Sánchez Jennifer.

### Tabla 9 Calificación del ovocito des-vitrificado

En el cuadro se observa la calificación del ovocito post descongelación donde se encuentra un citoplasma bien definido sin alteración alguna, una zona pelúcida con una densidad buena y una corona radiada óptima.

Morfología de ovocitos des-vitrificado	Calificación
<b>Zona pelúcida</b>	Buena
<b>Citoplasma</b>	Buena
<b>Corona radiada</b>	Buena

Fuente: Directa

Elaborado por: Sánchez Jennifer

## **Conclusiones**

- Los ovocitos obtenidos después de súper ovulación son morfológicamente aptos para vitrificación ya que están en grado uno y se encuentran en metafase dos.
- Los hallazgos de este estudio indican que la crioconservación de ovocitos en llamas mediante la técnica de vitrificación es adecuada para preservar el material genético.
- Los ovocitos están en condición aceptable después de la vitrificación, sin ninguna daño de sus estructuras.

## **Recomendaciones**

- Se recomienda valorar algún método de recolección eficaz para perfeccionar u obtener mayor cantidad de ovocitos.
- Para mejores resultados de producción de ovocitos se recomienda súper ovular a los animales de tal manera poder recolectar la mayor cantidad de ovocitos en metafase II.
- Se recomienda continuar evaluando la vitrificación para ovocitos de llamas considerando los diferentes estadios, ya que cada uno de ellos puede influir en la viabilidad post-descongelación.

## Bibliografía citada

### Libros

1. CHÁVEZ M, M Miragaya, E Capdevielle, B Rutter, S Guliano, A Agüero 2003, Maduración in vitro de oocitos de vicuñas; obtenidos por aspiración quirúrgica de folículos de ovarios súper estimulados. III Congreso de la Asociación Latinoamericana de Especialistas en pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos ALEPRYCS, Viña del Mar Chile.
2. ESTUDIO FAO Producción y Sanidad animal, Manual de Practicas de Manejo de Alpacas y llamas, Primer Edición, Editorial VIALLE DELLE TERME DI CARACALLA. Roma-Italia. Edición Española: 92-5-303903-5 Año Publicado 1996 Cap. 1 Págs. 13
3. FELIPE S. Martín H. Investigaciones Veterinarias del Perú (RIVEP), Vol. 7, Segunda Edición, Editorial Comité editorial. ISSN 1609-9117-0376-4370 Año Publicado 2006 Lima-Perú, Pág. 114.
4. FLORES Dabte M. (2006) Manual de Crianza de Alpacas, Primera Edición, POA 2006, Huancavelica Perú. Pág. 85.
5. FRANK. N Eduardo, Manejo Reproductivo de Camélidos Sudamericanos Domésticos, primera edición, Editorial obispo Trejo 323, Córdoba-Argentina Año de publicación 2000 pág. 3-4
6. GARCIA Wilbe , Vera, Danilo Pezo Carreón, Felipe San Martín H, Manual del Técnico Alpaquero, Primera edición, Edición y producción: ITDG AL Impreso por: Imprenta Amauta Impreso en Cusco-Perú, ISBN: 9972-47-113-6, Año de publicación Mayo de 2005. Pág. 7-8-9
7. GOMEZ O, Spermova reproducción Animal Pag. 103. Primera edición Volumen 01 ISSN: 2223-9375. Año 2013, Editorial SPRA, Perú
8. RUIZ A. Jaime B. Producción y Tecnología en Camélidos Sudamericano, Primera Edición, Editorial Talleres gráficos de la

- Universidad Nacional de Huancavelica, Perú 2011,ISBN 06295,  
Publicado Mayo 2011. Capitulo VII pág. 171-183.
9. PALMA A.G. (octubre 2001) Biotecnología de la reproducción  
Argentina Pag, 225 – 297 ISBN: 987-93-3779-8
  10. SEPÚLVEDA Noemí H. Manual para el Manejo de Camélidos  
Sudamericanos Domésticos, Primera Edición, Editorial SALVIAT  
Impresiones. Santiago de Chile ISBN 978-956-328-089-0 Año  
Publicado 2011 Págs. 14.
  11. VÁSQUEZ M. Dolores. Sanidad de Alpacas en la Etapa Neonatal.  
Primera Edición Septiembre 2010, Editorial Complutense, España  
ISBN: 978-84-9938-050-6, Año de publicación 2010.

**Páginas de internet:**

- a) CARDOZO A. [ fecha de creación diciembre 2005] ESPECIES  
ZOOTECNICAS NATIVAS DE LOS ANDES ALTOS [*en línea*][  
Fecha de consulta 02 mayo de 2013]

Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/009/ah223s/AH223S10.htm>

- b) COBO Ana; Sesión formativa; [ en línea ] Vitricación de Ovocitos [  
Fecha de consulta 23 de marzo del 2013] [ fecha de creación 23 de  
marzo 2008]

Disponible en:

[http://www.aebt.org/congreso2008/Documentacion/Programa\\_Cientifico/Sesion\\_Formativa/Ponencias/acobo.pdf](http://www.aebt.org/congreso2008/Documentacion/Programa_Cientifico/Sesion_Formativa/Ponencias/acobo.pdf)

- c) FERTILAB; Vitricación de óvulos [en línea] [fecha de consulta 28  
de marzo 2013] [fecha de creación 28 de junio 2011]

Disponible en:

<http://www.fertilab.net/descargables/consentimientos/VITRIFICACION.pdf>

- d) FIORI di. Libro de Histología [en línea] [fecha de consulta 30 de Abril  
de 2013] [fecha de creación Domingo, 27 de Junio de 2010]

Disponible en:

[http://terapiafisicavillarreal.blogspot.com/2010\\_06\\_01\\_archive.html](http://terapiafisicavillarreal.blogspot.com/2010_06_01_archive.html)

- e) GÓMEZ O. (et al); *[en línea]* Técnicas del slicing y aspiración folicular en la eficiencia de la recuperación de ovocitos bovinos criollos post-morten en el camal [fecha de creación 2012] [Fecha de consulta 08 de diciembre 2013]

Disponible en:

<http://www.reproduccionanimal.org/site3/files/revistas/spermova2/38-39-Gomez-ovocito.pdf>

- f) GIGLI, I; Russo, A.; Agüero, A. InVet; versión On-line ISSN 1668-3498 [en línea] Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos; [Fecha de consulta 3 de marzo 2013] [fecha de creación diciembre 2006]

Disponible en:

[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1668-34982006000100018](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1668-34982006000100018)

- g) HUANCA Wilfredo. [ fecha de creación 26 octubre de 2011] Los Desafíos en el Manejo Reproductivo de los Camélidos Sudamericanos *[en línea]* [ Fecha de consulta 04 mayo de 2013]

Disponible en: <http://blog.ucc.edu.ar/supprad/files/2011/12/Conferencias-Camelidos-sudamericanos.pdf>

- h) JUARRANZ de la F. Ángeles (et al); *[en línea]* Foliculogénesis en vertebrados (II), [ Fecha de consulta 5 de mayo del 2013] [Fecha de creación 28 de noviembre de 2012]

Disponible en:

<http://www.uam.es/departamentos/ciencias/biologia/citologia/practica4.htm>

- i) PALMA A. Gustavo, [en línea] Biotecnología de la reproducción. [ Fecha de consulta 9 de marzo del 2013] [Fecha de creación 2007]

Disponible en: [http://www.reprobiotec.com/novedades\\_piv\\_02.html](http://www.reprobiotec.com/novedades_piv_02.html)

- j) ROSSI A. Carlos; Camélidos Sudamericanos; [fecha de creación Marzo 2004] [en línea] [Fecha de consulta 15 de mayo 2013]

Disponible en:

[http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/camelidos\\_rossi.htm](http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/camelidos_rossi.htm)

- k) RUIZ B. Jaime (et al); Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú; [fecha de creación septiembre 2011] ISSN 1609-9117 [en línea] Activación química de ovocitos de alpaca vitrificados después de la maduración in vitro. [Fecha de consulta 10 de marzo 2013]

Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172011000300005&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172011000300005&script=sci_arttext)

- l) RUIZ J, JE Correa, M Martínez; Archivos de medicina veterinaria; [fecha de creación 2010] ISSN 0301-732X [en línea] Vitrificación de ovocitos bovinos y su uso en el desarrollo partenogénico de embriones [Fecha de consulta 15 de mayo 2013]

Disponible en:

[http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?pid=S0301-732X2010000100011&script=sci\\_arttext](http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?pid=S0301-732X2010000100011&script=sci_arttext)

- m) URRUTIA A. [ fecha de creación diciembre 2006] LLAMA (Lama glama) Al Servicio del Hombre Andino [en línea][ Fecha de consulta 02 mayo de 2013]

Disponible en: [http://www.peruecologico.com.pe/fau\\_llama\\_1.htm](http://www.peruecologico.com.pe/fau_llama_1.htm)

n) VARGAS L. Tominaga (et al); *[en línea]* Embarazo mediante tratamiento de maduración in vitro de ovocitos en paciente amenorreica y con historia de anorexia nervosa, [ Fecha de consulta 6 de mayo del 2013] ISSN 2304-5132 versión on-line Lima 2012 [Fecha de creación 30 de marzo de 2012]

o) VERACRUZ H. Ver; Comparación de dos Métodos de Criopreservación de Ovocitos Bovinos [fecha de creación Diciembre 2006] *[en línea]* [Fecha de consulta 15 de mayo 2013]

Disponible en:

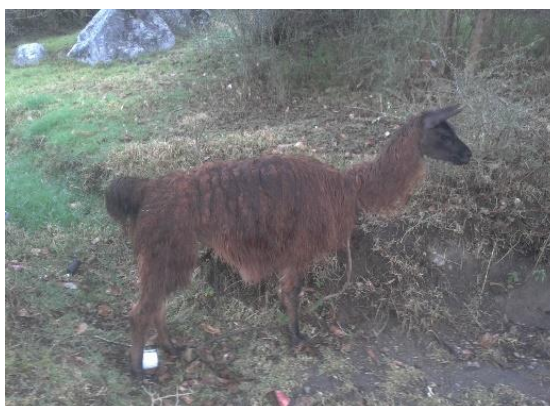
<http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/9755/2/maestria%20Oscar%20Zarate%20Guevara.pdf>

p) VEECK LL. Oocyte; Clasificación y cultivo de ovocitos *[en línea]* Estado Madurativo de los ovocitos [fecha de consulta 29 de marzo de 2013] [fecha de creación 2007]

Disponible en: <http://nuevo.sefertilidad.com/recomendaciones/22.pdf>

# Anexos

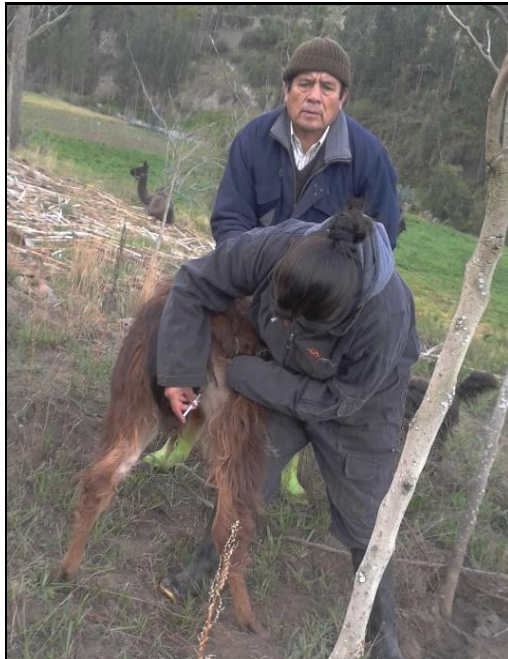
## Anexo 1 Fotografías del trabajo de campo



Llamas seleccionadas para la investigación

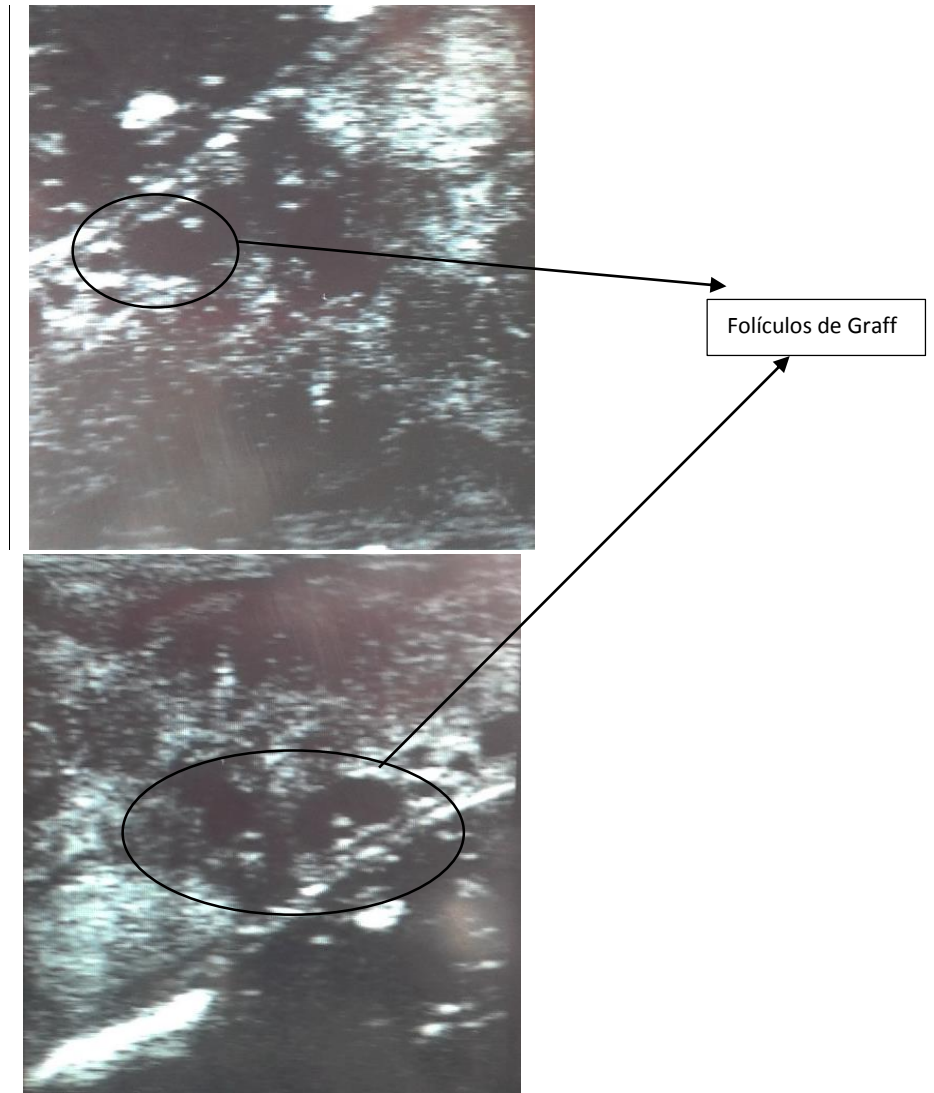
## Anexo 2 Fotografías aplicando el medicamento





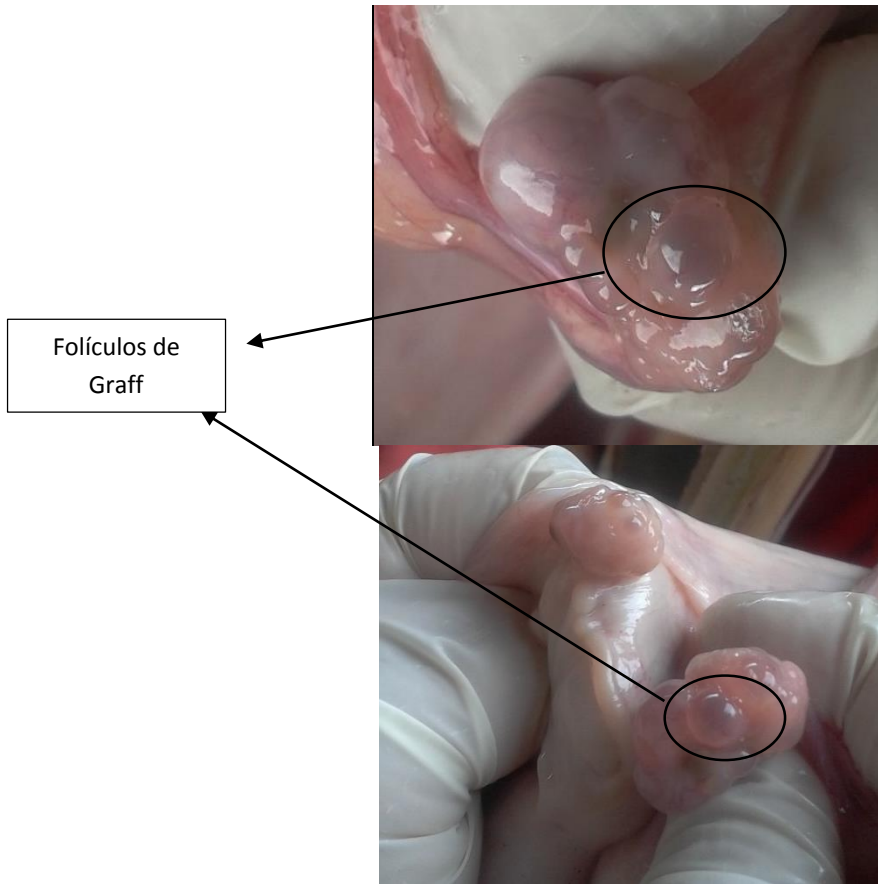
Inducción a la súper ovulación

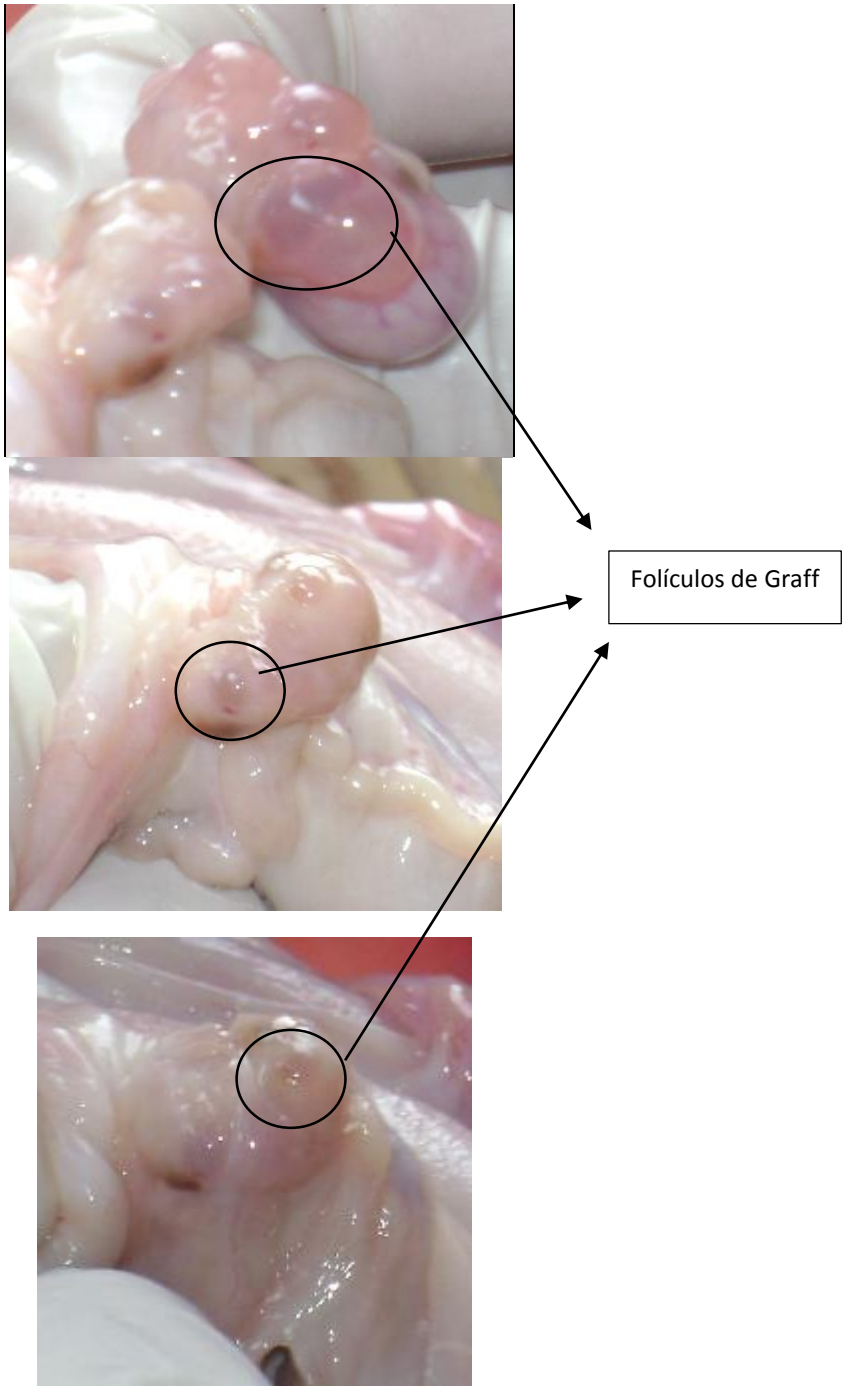
### Anexo 3 Chequeo ecográfico



Control ecográfico después de la súper ovulación

#### Anexo 4 Ovarios de llamas





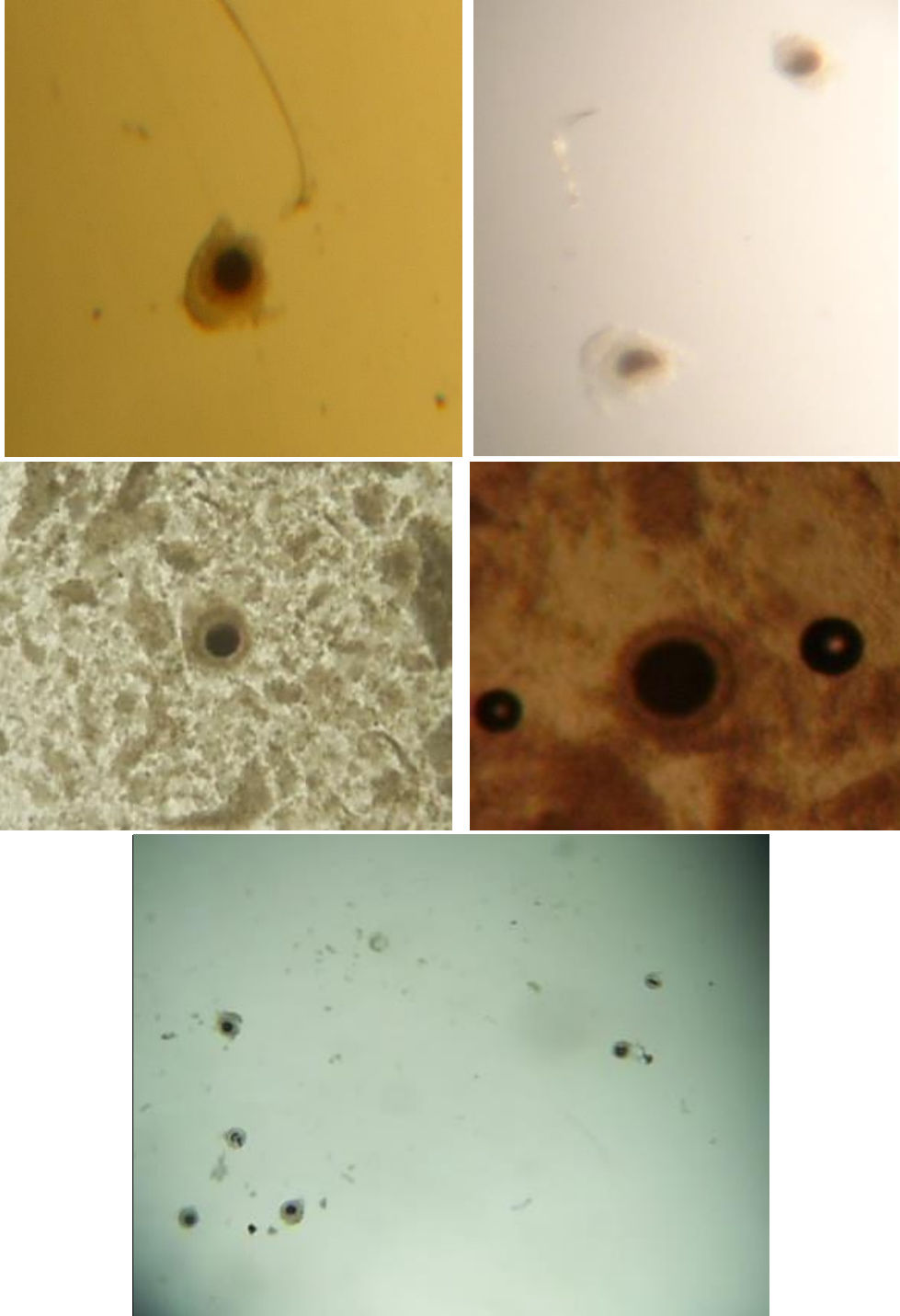
Ovarios de llama súper ovuladas

## Anexo 5 Ovarios en el laboratorio



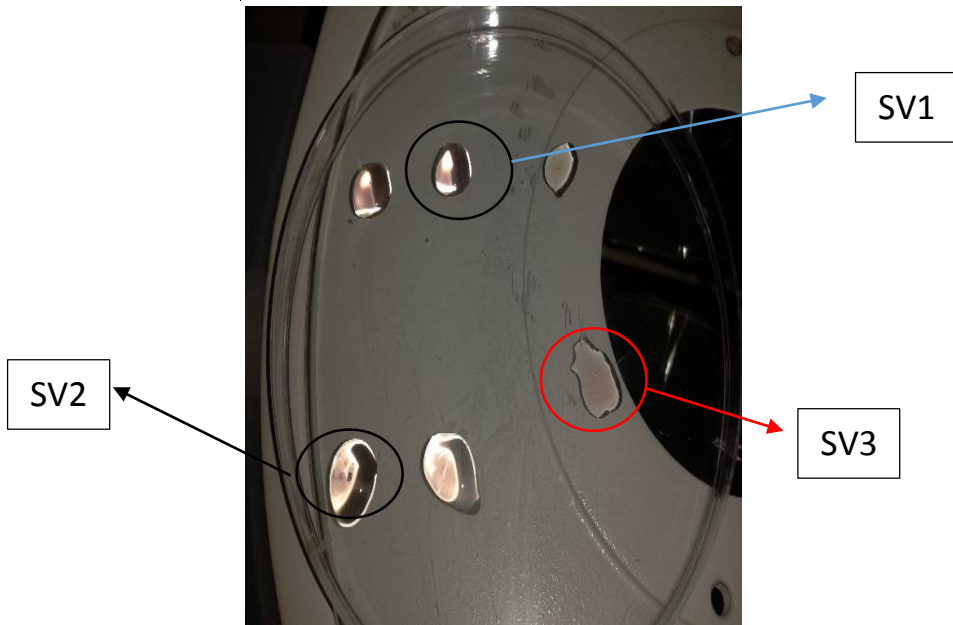
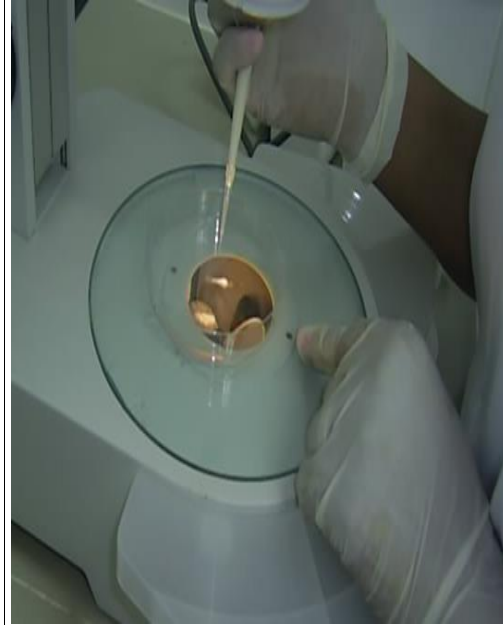
Extracción de ovocitos

## Anexo 6 Ovocitos

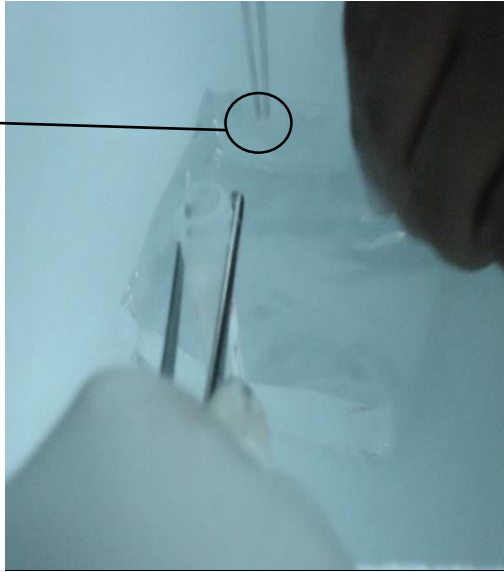


Ovocitos en metafase II grado I

## Anexo 7 Vitrificación de ovocitos



Micro gota  
vitrificada

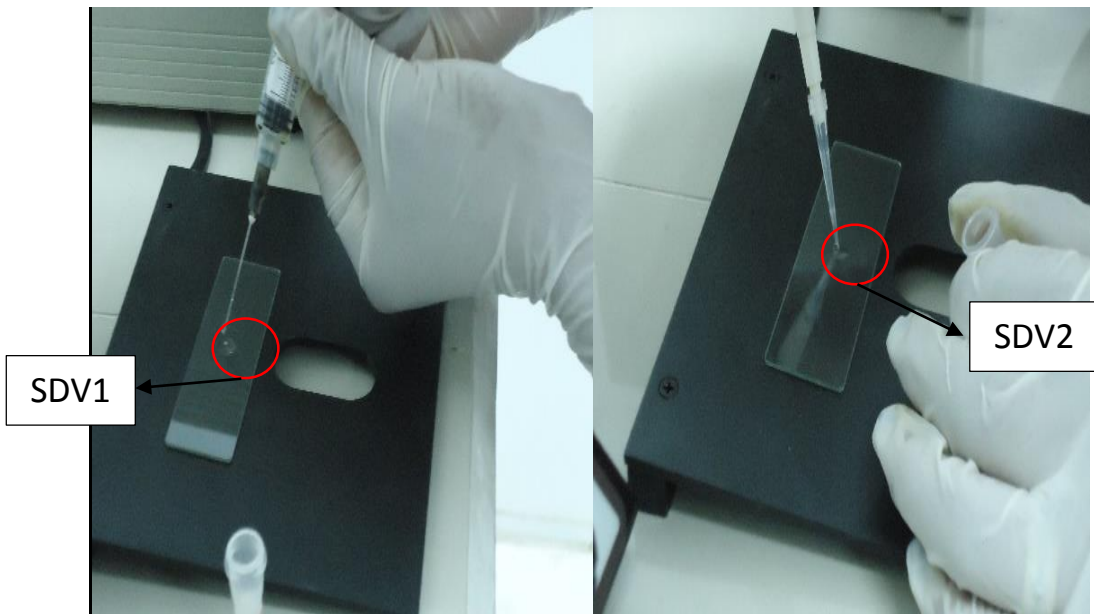


Aplicación de los medios de vitrificación



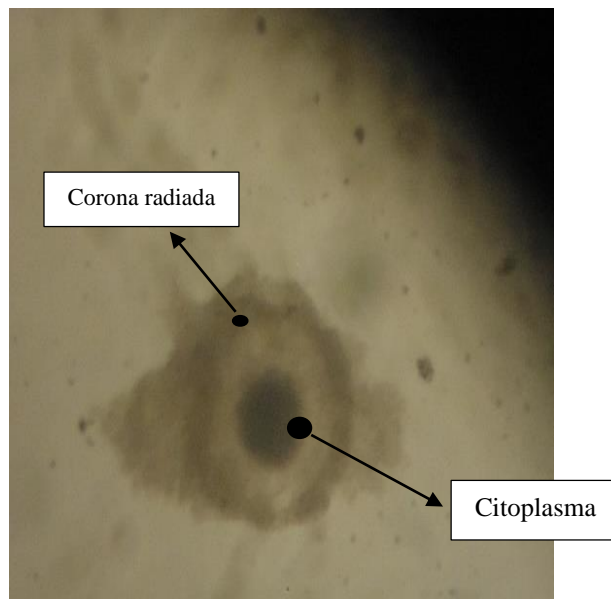
Almacenado en el tanque de nitrógeno líquido

### Anexo 8 ovocito des-vitrificación



Aplicación de medios de des-vitrificación

### Anexo 9 ovocito vista microscópica



Partes del ovocitos des-vitrificado