



ANEXO 1

FORMATO PARA LA PRESENTACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN CON EL FINANCIAMIENTO DEL FEDU

1. Título del proyecto

COMPARACION DE DOS TIPOS PRODUCCION DE EMBRIONES DE ALPACAS EN LA VITRIFICACION

2. Área de Investigación

Área de investigación	Línea de Investigación	Disciplina OCDE
Reproducción animal	Criopreservación de embriones	Ciencias Veterinarias

3. Duración del proyecto (meses)

12 meses

4. Tipo de proyecto

<u>Individual</u>	<input type="radio"/>
<u>Multidisciplinario</u>	<input type="radio"/>
<u>Director de tesis pregrado</u>	<input type="radio"/>

4. Datos de los integrantes del proyecto

Apellidos y Nombres	Manuel Guido Pérez Durand Uri Harold Pérez Guerra
Escuela Profesional	Medicina Veterinaria y Zootecnia
Celular	947562135 992000419
Correo Electrónico	mqperez@unap.edu.pe uperez@unap.edu.pe

I. Título

COMPARACION DE DOS TIPOS PRODUCCION DE EMBRIONES DE ALPACAS EN LA VITRIFICACION

II. Resumen del Proyecto de Tesis (Debe ser suficientemente informativo, presentando -igual que un trabajo científico- una descripción de los principales puntos que se abordarán, objetivos, metodología y resultados que se esperan)

El presente trabajo de investigación tiene la finalidad de vitrificar embriones de alpacas de producción de superestimulación del ovario con la aplicación de una hormona folículo estimulante sintética y embriones de producción única o fisiológica, en los embriones antes de vitrificar se evaluarán las características morfológicas y después de la desvitrificación también se evaluarán la morfología y la re-expansion por el cultivo en medio específico para camélidos. Para la



vitrificación se emplearán concentraciones altas de glicerol y etilenglicol y para la rehidratación de los embriones se utilizarán un azúcar denominado la galactosa. Los resultados del presente estudio servirían como un instrumento de mejoramiento genético en esta especie aprovechando a las hembras de alto valor genético, transfiriendo los embriones a receptoras de menor calidad.

III. Palabras claves:

Embriones, vitrificación, descongelación, evaluación, viabilidad

IV. Justificación del proyecto

En nuestro país, la crianza de camélidos sudamericanos es la principal actividad socioeconómica y es la única fuente de sustento económico para muchas familias alto andinas, pero que en la actualidad presentan deficientes índices de productividad en la calidad de fibra y carne, el intervalo generacional y la capacidad fisiológica de una hembra que solo puede tener hasta 5 crías, durante toda su vida reproductiva, por ello es importante mejorar el progreso genético (Novoa, 1992). El uso de tecnologías reproductivas, como la criopreservación de embriones, podrían contribuir al mejoramiento de estas especies e incrementar los ingresos de la población de esta zona del país (Dobrinsky et al., 2000).

Existen dos métodos de criopreservación de embriones. Entre ellos está el método de congelación convencional, el que consiste en una congelación lenta y el método de vitrificación la cual consiste en un enfriamiento muy rápido en la que ambos métodos pueden producir daños en los embriones, pero el tipo y grado de los daños dependen probablemente del método de criopreservación empleado (Kaidi et al., 2001). En la vitrificación y es menos probable que ocurran daños relacionados a la formación de cristales de hielo, además los embriones pueden ser criopreservados en menor tiempo la que busca generar una alta viscosidad y una rápida solidificación de las soluciones de vitrificación (Vasquez, 2008).

Desarrollar protocolos de criopreservación de embriones de alpacas, nos permitirá disponer de una herramienta que, aplicado adecuadamente en un programa de mejoramiento genético, que contribuiría al mejoramiento y la calidad de las alpacas y otros camélidos sudamericanos (Vásquez et al., 2011).

Por lo tanto, el presente estudio pretende comparar embriones de producción de ovulación única y de superovulación aplicando el método de vitrificación y su posterior evaluación a desvitrificación sobre la sobrevivencia y que posteriormente podría transferido a receptoras.

V. Antecedentes del proyecto

En Sudamérica la aplicación de la vitrificación de embriones de llamas realizó investigadores argentinos, los embriones procedían de hembras superovuladas y los protocolos de vitrificación fueron adecuados de otras especies como el de vacunos, reportaron que posterior a la transferencia de los embriones desvitrificados la tasa de preñez fue del 33% (Aller et al., 2002).

La criopreservación de embriones de camélidos se inició en el Perú después de 13 años que realizaron los investigadores argentinos, evaluando los métodos de criopreservación (convencional y vitrificación) de embriones de llamas donde los embriones procedieron de hembras con ovarios superestimulados y que evaluaron en forma in vitro e in vivo logrando gestaciones del 16% para embriones vitrificados y el 0% para embriones de congelación



lenta (Vasquez y Col., 2011). Paredes y col. (2015) realizaron una congelación convencional en embriones de alpacas con crioprotectores a base de etilenglicol y dimetilsulfoxide, logrando la sobrevivencia a la descongelación de 100% y 66% respectivamente para ambos crioprotectores y la transferencia reportaron de preñez el 58% y 37% a los 30 días post ecografía y a los 60 días post ecografía solo permanecieron el 10% de gestaciones.

Recientemente en un reporte indican haber logrado el nacimiento de una cría alpaca producto de la vitrificación, donde los investigadores reportan el nacimiento de una cría viva después haber transferido tres embriones vitrificados a tres hembras receptoras (Lutz et al., 2020).

En camellos en los últimos 3 años ha progresado la técnica de vitrificación de embriones, aplicando protocolos específicos para embriones de camellos y donde reportan resultados halagadores que se pueden aplicar en embriones de camélidos sudamericanos (alpacas y llamas), debido a que son animales del mismo genero y la diferencia es la especie. Entre los resultados indican que después de transferir los embriones desvitrificados a receptoras reportan gestaciones de 46%, 48% y 50% después de realizar el diagnostico de gestación a los 60 días post transferencia (Herrid et al., 2017; Skidmore et al., 2020; Skidmore et al., 2021).

VI. Hipótesis del

HO:

Que los embriones de alpacas de producción de la estimulación del ovario y los embriones de producción de ovulación única toleran a los crio protectores de la vitrificación en forma similar, logrando la supervivencia posterior a desvitrificación (descongelación).

VII. Objetivo general

Determinar la proporción de la viabilidad de los embriones de alpacas de producción de la estimulación ovárica y ovulación única al efecto de la vitrificación

VIII. Objetivos específicos

1. Determinar el % de viabilidad de los embriones de producción de estimulación ovárica al efecto de la vitrificación con las pruebas de tamaño del embrión antes y después de la de la vitrificación (morfología) y la sobrevivencia al cultivo.
2. Determinar el % de viabilidad de los embriones de producción de ovulación única al efecto de la vitrificación con las pruebas de tamaño del embrión antes y después de la de la vitrificación (morfología) y la sobrevivencia al cultivo.

IX. Metodología de investigación

ANIMALES

Se utilizarán 24 hembras alpacas de la raza Suri como donadoras de embriones, adultas que por lo menos hayan tenido una experiencia de parto, que las hembras serán evaluadas ginecológicamente que no tengan ningún tipo de anormalidades en el tracto genital, si secreciones aparentes a infecciones uterinas.



PRODUCCIÓN DE EMBRIONES

En las hembras se revisarán los ovarios utilizando un ecógrafo, para determinar el estatus del ovario y especialmente se encontrarán los folículos dominantes tomando sus medidas respectivas.

En las hembras que tuviesen el folículo dominante por encima de los 7 mm se les realizara la aspiración folicular o ablación, con la finalidad de sincronizar el crecimiento de la onda folicular siguiente (Ratto et al., 2011) y todo el protocolo de superovulación.

A los 2 días posteriores se iniciará la aplicación de FSHr (hormona folículo estimulante recombinante) en dosis de 200 mg divididas en 5 dosis decrecientes en 5 días, aplicando la inyección intramuscular solo en las mañanas.

El día 6 o 7 se realizará una evaluación ecográfica para determinar el tamaño y número de folículos crecidos, donde como requisito los folículos deben tener un tamaño de 7 mm.

En las hembras que cumplan el requisito se les hará montar con macho entero y al día siguiente se les repetirá una nueva monta.

El lavado uterino para recuperar los embriones se realizará a los 8 días post monta, con ayuda de una sonda de Foley Nro. 16 se introducirá en útero de las hembras y para lavar se utilizará el medio de lavado de PBS-D, en cada lavado se utilizarán 15 a 25 ml de medio dependiendo del tamaño del tracto genital de la hembra.

Los embriones recuperados se mantendrán a temperatura de cuarto y un medio de mantenimiento PBS-D enriquecido con el 5% de suero de alpaca. En los embriones colectados se evaluarán la categoría, tamaño y los que cumplan con los requisitos de las características se vitrificarán.

Para la producción de embriones de ovulación única o fisiológica a las hembras de la misma forma se les realizará la sincronización de la onda folicular, esperando el crecimiento del folículo dominante y el tratamiento de monta, colección y evaluación de embriones será la misma forma como para las hembras que se trataron para estimular los ovarios o superovularlos.

VITRIFICACIÓN

Para la vitrificación los medios se prepararán de acuerdo a las recomendaciones como indica Herrid et al. (2017)

Medio de mantenimiento

Se preparará la solución salina fosfatada sin la adición cloruros de calcio y magnesio (PBS-D) y se le adicionará 0.3 mM de piruvato de sodio, 3.3 mM de glucosa, 50 ug de gentamicina/mL y 20% de suero fetal (v/v).

Solución de vitrificación

Se prepararán 3 soluciones de acuerdo a la recomendación de Herrid et al., (2017).

Solución de vitrificación 1 (SV1): será compuesto de 1.4 M glicerol.

Solución de vitrificación 2 (SV2): 1.4 M glicerol + 3.6 M etilenglicol.

Solución de vitrificación 3 (SV3): 3.4 M glicerol + 4.6 M etilenglicol.

Solución de desvitrificación (calentamiento)



Se preparará de la siguiente manera:

Solución de desvitrificación 1 (SD1): 0.5 M de galactosa.

solución de desvitrificación 2 (SD2): 0.25 M de galactosa.

Proceso de vitrificación

La vitrificación se ejecutará de acuerdo al protocolo designado a em embriones colectado a los 8 días post monta en pajillas abiertas llenada (Vajta et al., 1998).

Los embriones seleccionados a vitrificar serán lavados en 50 uL del medio de mantenimiento, luego serán tratados secuencialmente con 500 uL en SV1 y SV2 en 5 minutos en cada solución. Luego los embriones serán expuestos en 2 gotas de SV3 por 20 a 30 segundos todo a temperatura de cuarto (25°C) siendo luego cargada en la pajilla abierta e inmediatamente introducido dentro el nitrógeno líquido y almacenados hasta su evaluación.

Desvitrificación (calentamiento).

La pajilla sacada conteniendo el embrión del nitrógeno líquido se mantendrá por 3 segundos en el medio ambiente y luego sumergirlo inmediatamente dentro 1 mL del SDV 1 dentro una placa de 4 pozos a 37°C y los embriones serán incubados por 1 minuto, secuencialmente los embriones serán transferidos a 1 mL de SD2 a 24°C por 5 minutos y finalmente el embrión será trasladado a 1 mL de medio de mantenimiento otros 5 minutos. Después de la desvitrificación los embriones serán re-evaluados.

Cultivo

Los embriones desvitrificados serán cultivados en un medio de cultivo específico para camélidos, dentro una incubadora de CO₂ por 5 días (evaluando su desarrollo a las 2, 24, 48, 72 y 96 horas) evaluando su sobrevivencia y desarrollo (embriones normales, sin lisis y arrugamientos o viendo el citoplasma su normalidad).

Estadístico

Los datos obtenidos como proporciones se someterán a una prueba de homogeneidad y luego a una prueba de chi-cuadrado.

X. Referencias

Aller, J.F. Rebuffi, G.E., Cancino, A.K., Alberio, R.H. 2002. Successful transfer of vitriefied (Lama glama) embryos. Anim. Reprod. Sci. 73: 121-127.

Herrid, M., Billah, M., Skidmore, J.A. 2017. Successful pregnancies embryos in the dromedary camal: Avoidance of a possible toxic effect of sucrose on embryos. Anim. Reprod. Sci. xx,xx,xx.

Lutz, J.C., Johnson, S.L., Duprey, K.J., Taylor, P.J., Vivanco Mackie, H.W., Ponce-Salazar, D., Miguel-Gonzales, M., Yungs, C.R. 2020. Birth of live cria after transfer of vitrified-warmed alpaca (Vicugna pacos) preimplantation embryo. Frontiers in Veterinary Science. Vol 7 art. 581817

Skidmore, J.A., Vaughan, J.L., Herrid, M. 2020. Successful vitrification of dromedary camel embryos usin novel embryos vitrification kit. Anim. Reprod. Sci. 218: 106483.



Skidmore, J.A., Vaughan, J.L., Malo, CL. M., Herrid, M. 2021. Comparison of two closed vitrification methods for vitrifying dromedary camel (*Camelus dromedarius*) embryos. *Theriogenology* 173:123-127.

Vasquez, M., Cueva, S., Cordero, A., Gonzales, M.L., Huanca, W. 2011. Evaluación de dos métodos de crioconservación de embriones de llamas sobre la tasa de supervivencia in vivo e in vitro. *Rev. Inv. Vet. Peru.* 22(3)190-198.

XI. Uso de los resultados y contribuciones del proyecto

El uso de los resultados del presente estudio serviría para aprovechar los embriones de los animales de alta genética y que posteriormente pueden ser transferidos a receptoras de menor calidad así de esta manera incrementando la producción en esta especie y en favor de sus criadores.

XII. Impactos esperados

i. Impactos en Ciencia y Tecnología

Generar una biotecnología en camélidos sudamericanos, pudiendo de esta manera preservar la especie en bancos de germoplasma

ii. Impactos económicos

Logrando con esta biotecnología descendencia de animales de alta producción en cuanto a fibra, finura y color.

iii. Impactos sociales

Con la tenencia de esta cría vía esta biotecnología los productores podrían vender sus animales vivos o productos en precios elevados que redundaría en bienestar económico y social de las familias que crían estas alpacas.

iv. Impactos ambientales

Durante su proceso de esta biotecnología se utilizan componentes biológicos que degradan fácilmente en el ambiente por lo tanto no se contaminaría el medio ambiente.

XIII. Recursos necesarios

INFRAESTRUCTURA

Laboratorio
Corrales de aparto
Corrales individuales

EQUIPO

Tanque de nitrógeno líquido
Microscopio estereoscopio
Calentador para microscopio



Placas petry diferentes pozos

Camara fotografica

MEDIOS

PBS-D

FSHp

GnRH

Prostaglandinas

Medio de cultivo

Glicerol

Etilenglicol

Galactosa

Antibióticos

Pajillas

Conos de plástico

Lapiceros indelebles

Cuaderno

Nitrógeno liquido

Sonda de foley

Filtro encom

XIV. Localización del proyecto

El trabajo de investigación se llevará a cabo en el megalaboratorio del Centro de Investigación y Producción de Chuquibambilla, perteneciente a la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano. El CIP Chuquibambilla esta ubicado a 3879 msnm, encontrándose a una distancia de 159 km carretera Puno-Cusco.

XV. Cronograma de actividades

Actividad	Trimestres												
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
Ejecución del proyecto	X	X	X										
Cultivo in vitro de los embriones vitrificados				X									
Recopilación de Literatura y tabulación de datos					X	X	X	X					
Redacción y entrega de informe									X	X	X	X	

XVI. Presupuesto

Descripción	Unidad de medida	Costo Unitario (S/.)	Cantidad	Costo total (S/.)
PBS-D	litro	30.00	5	150.00
FSHp	frasco	300.00	10	3000.00
Glicerol	frasco	50.00	500 ml	50.00
Etilenglicol	frasco	50.00	500 ml	50.00
Nitrogen liquido	kilo	15	10 kilos	150.00
Sonda de foley	Unidad	35.00	10 sondas	350.00
Filtros emcom	Unidad	35.00	10 filtros	350.00
Pajillas	Bolsa de 5	2.00	10 bolsas	100.00
Placas petry	Bolsa de 6	5.00	10.00 bolsas	300.00



Nota el FSHr ; es una colaboración de la Universidad de Concepcion de Chile.
