

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA**



**Efecto de la suplementación de dos agentes capacitantes en el  
medio de fertilización para la producción *in vitro* de embriones  
en alpacas (*Vicugna pacos*) a 2750 msnm – Ayacucho 2017**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
MÉDICO VETERINARIO**

**PRESENTADO POR:  
Walter Palomino Guerrero**

**Ayacucho - Perú**

**2019**

*Primero a Dios, por darme la vida, por ser mi guía y mi luz, por darme la fuerza y la voluntad para alcanzar todas mis metas.*

*A mis PADRES, Rolando y Lucila por el trabajo constante y sacrificio abnegado, por su dedicación, por su invaluable ejemplo que me dieron para la vida, a mis hermanos, por su apoyo, el esfuerzo y la comprensión, a mis familiares, quienes hicieron que esta etapa de mi vida se lograra*

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, mi alma mater, por abrirme sus puertas para brindarme todos los conocimientos en mi formación profesional. A la facultad de Ciencias Agrarias, por darme la oportunidad para prepararme.

A la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria, por albergarme en sus aulas y laboratorios, y a los docentes quienes contribuyeron en la formación ética profesional en mi educación universitaria.

Al Mg. Sc. César A. Olaguivel Flores, asesor de este trabajo de investigación, por su sapiencia, la dedicación, la confianza y la oportunidad brindada para que se ejecute este trabajo de investigación.

A la Estación Experimental Agraria CANNAN-INIA, por el ambiente brindado para que se lleve a cabo la investigación.

A la Ing. Mary Luz Naveros Flores, encargada del Programa Nacional de Investigación en Camélidos del INIA-Ayacucho y co-asesora de este trabajo de investigación, por su confianza, orientación y la oportunidad brindada para poder ejecutar el presente trabajo.

Al M.V. Mijail Contreras Huamaní, co-asesor del presente trabajo de investigación, por su constante apoyo e incansable, por su confianza, la amistad, y las enseñanzas brindadas de manera desprendida durante el desarrollo de la presente tesis.

A los M.V. Ronal Robles Quispe, Edwin Mendoza Alacute y MVZ José Loza del Carpio equipo técnico del proyecto, quienes con su apoyo y conocimientos brindados contribuyeron el desarrollo de la presente tesis.

A la Blga. Chissthel Guillen y amigo Andrés Ramírez Rojas, compañeros de tesis, por su apoyo incondicional e incansable, por su amistad y la alegría brindada durante el desarrollo de la presente tesis.

A todas aquellas personas que de una u otra forma apoyaron en el desarrollo de esta tesis y permitieron alcanzar un objetivo más en mi vida; **SER PROFESIONAL.**

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Índice general.....	iv
Índice de tablas .....	vi
Índice de figuras.....	vii
Índice de anexos.....	viii
Resumen.....	11
Introducción .....	13
<b>CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>15</b>
1.1. Antecedentes de agentes capacitantes en estudio .....	15
1.2. Anatomía y fisiología reproductiva de las alpacas.....	19
1.2.1. Ovarios .....	19
1.2.2. Oviductos .....	20
1.2.3. Útero.....	20
1.2.4. Cérvix.....	20
1.2.5. Vagina y vulva .....	20
1.3. Crecimiento de ovocitos y folículos.....	21
1.3.1. Ovogénesis .....	21
1.3.2. Diferenciación fetal de las células .....	21
1.3.3. Multiplicación celular .....	22
1.3.4. Foliculogénesis.....	23
1.3.5. Maduración de ovocitos .....	26
1.3.6. Fertilización in vivo .....	28
1.4. Desarrollo embrionario .....	31
1.4.1. Segmentación o división celular .....	31
1.4.2. Formación de blastocistos .....	32
1.5. Producción in vitro de embriones .....	32
1.5.1. Obtención de ovocitos (cúmulos-ovocitos).....	33
1.5.2. Selección de ovocitos.....	34
1.5.3. Factores importantes para la producción in vitro de embriones .....	35
1.5.4. Maduración in vitro de ovocitos .....	35

1.5.5. Fertilización in vitro de ovocitos .....	36
1.5.6. Selección de espermatozoides.....	38
1.5.7. Métodos de selección y capacitación de espermatozoides.....	39
1.5.8. Agentes capacitantes de los espermatozoides .....	40
1.5.9. Cultivo in vitro de cigotos.....	47
<b>CAPÍTULO II: METODOLOGÍA .....</b>	<b>51</b>
2.1. Lugar del experimento .....	51
2.2. Materiales y equipos .....	51
2.2.1. Materiales de laboratorio .....	51
2.2.2. Materiales de campo .....	51
2.2.3. Materiales biológicos .....	52
2.2.4. Equipos.....	52
2.2.5. Medios para la fertilización in vitro .....	52
2.3. Problema específico .....	53
2.4. Procedimiento de la fertilización in vitro.....	53
2.4.1. Preparación de medios .....	53
2.4.2. Obtención de ovarios y testículos .....	54
2.4.3. Recuperación y selección de ovocitos .....	54
2.4.4. Maduración in vitro de ovocitos .....	54
2.4.5. Fertilización in vitro de ovocitos .....	55
2.4.6. Cultivo in vitro de cigotos.....	56
2.4.7. Clasificación de embriones .....	57
2.5. Diseño estadístico .....	57
<b>CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>59</b>
3.1. Porcentaje de recuperación de ovocitos viables .....	59
3.2. Promedio (%) de producción de embriones .....	60
3.3. Promedio (%) de producción de embriones según calidad .....	65
Conclusiones.....	67
Recomendaciones .....	68
Referencia bibliográfica.....	69
Anexo.....	83

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1.1. Categorización de ovocitos.....	34
Tabla 2.1. Escala de clasificación de calidad embrionaria, según IETS.....	57
Tabla 3.1. Porcentaje de recuperación de ovocitos viables por método Slicing...	59
Tabla 3.2. Promedio de ovocitos viables por ovario, recuperados por método Slicing en alpacas ( <i>Vicugna pacos</i> ), Ayacucho 2017.....	60
Tabla 3.3. Promedio de clivaje a las 24h pos-cultivo suplementados con PHE y Heparina en el medio de fertilización con cigotos de alpaca ( <i>Vicugna pacos</i> ).....	61
Tabla 3.4. Promedio de producción de mórulas con la suplementación de Heparina y PHE en el medio de fertilización con cigotos de alpacas ( <i>Vicugna pacos</i> ).....	62
Tabla 3.5. Promedio producción de blastocistos con la suplementación de Heparina y PHE en el medio de fertilización con cigotos de alpacas ( <i>Vicugna pacos</i> ) 2017.....	63
Tabla 3.6. Promedio de producción de embriones con la suplementación de Heparina y PHE en el medio de fertilización con cigotos de alpacas ( <i>Vicugna pacos</i> ).....	64
Tabla 3.7. Promedio de producción de embriones según calidad con la suplementación de Heparina y PHE en el medio de fertilización con cigotos de alpacas ( <i>Vicugna pacos</i> ).....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1.1. Diagrama de meiosis en mamíferos.....	23
Figura 1.2. Representación de los factores que intervienen en formación de células germinales primordiales (PGC), la ovogénesis y foliculogénesis. Factores ováricos producidos por las células/estroma teca (en azul), las células somáticas/granulosa (en morado), las células germinales (en rojo) o en ambas células germinales y células de la granulosa (verde), ovocitos participan y regulan el desarrollo de los folículos en cada una de las etapas definidas en toda la foliculogénesis. Los factores de transcripción implicados se indican con un asterisco (*). Las proteínas del ectodermo extra embrionario que participan en la formación de PGC se indican en negro.....	25
Figura 1.3. Eventos producidos durante la fecundación, en las diferentes regiones anatómicas del oviducto.....	31

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo 1. Preparación de los stocks para los medios.....	84
Anexo 2. Preparación medios para la producción in vitro de embriones.....	86
Anexo 3. Registro fotográfico de materiales y equipos de laboratorio.....	88
Anexo 4. Registro fotográfico del proceso de producción in vitro de embriones.....	89
Anexo 5. Análisis de varianza.....	91
Anexo 6. Resultados de la investigación.....	93
Anexo 7. Clasificación de embriones.....	97

## ABREVIATURAS

**AC:** Adenilato Ciclasa

**AMPc:** Adenosin Monofosfato Ciclico

**BSA:** Albúmina Serica Bovina

**CGP:** Células Germinales Primordiales

**COCs:** Complejo Cumulus-Ovocito

**CSA:** Camélidos Sudamericanos

**CIV:** Cultivo in Vitro

**DMSO:** Dimetilsólfoxido

**EG:** Etelinglicol

**EFG:** Factor de Crecimiento Epidérmico (Epidermal Growth Factor)

**FIV:** Fertilización in Vitro

**FSH:** Hormona Folículo Estimulante

**GAG:** Glicosaminoglicano

**GC:** Gránulos Corticales

**GL:** Glicerol

**GPI:** Glicosilfosfatidil Inositol

**HEPES:** Hidroxietilpiperazine ácido N-2-etaesúlfico

**hCG:** Gonodotropina Coriónica Humana (Human Chorionic Gonadotrophin)

**ICSI:** Inyección Espermática Intracitoplasmática (Intracytoplasmic Sperm Injection)

**IGF1:** Factor de Crecimiento Epidermal asociado a la Insulina 1

**KSOM:** Medio Optimizado Simple de Potasio (Potassium Simplex Optimized Medium)

**LH:** Hormona Luteinizante

**MAPK:** MAP Kinasa (ensima)

**MIV:** Maduración *in Vitro*

**mM:** Mili moles

**μM:** Micro moles

**OPU:** *Ovum Pick-Up*

**PBS:** Solución Salina Fosfatada (Phosphate Buffered Saline)

**PGF2α:** Prostaglandina F2α

**PGE:** Prostaglandina E2

**PHE:** Penicilamina, Hipotaurina y Epinefrina.

**PN:** Pronúcleo

**PVP:** Polivinilpirrolidona

**SOF:** Fluido Oviductal Sintético

**TALP-FIV:** Medio Tyrode (albúmina-lactato-piruvato)

**TALP-SPERM:** Medio Tyrode (albúmina-lactato-piruvato)

**TCM 199:** Medio de Cultivo Tisular 199

**TGFβ1:** Factor de Transformación del Crecimiento β.

**VG:** Vesícula Germinal

**ZP:** Zona Pelúcida

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló con el objetivo de evaluar el efecto de dos agentes capacitantes en el medio de fertilización para la producción *in vitro* de embriones en alpacas (*Vicugna pacos*). Los ovarios se obtuvieron del matadero Municipal de Pilpichaca (Huancavelica) y fueron transportados en SSF al 0.9%, más gentamicina a una temperatura de 37°C. De los 227 ovarios recolectados se recuperaron 1132 ovocitos viables, con una media de recuperación de  $5.00 \pm 0.42$  ovocitos viables/ovario. Los ovocitos seleccionados fueron de calidad I, II y III, luego puestos a maduración en medio TCM-199 por 34 a 36h. Los ovocitos maduros se distribuyeron de forma aleatoria en cuatro tratamientos de medio de fertilización suplementados con heparina al 2% y PHE (2mM de Penicilamina, 1mM de Hipotaurina y 250mM de epinefrina), según la siguiente distribución: **T1**=Control; **T2**=Heparina; **T3**=PHE; **T4**=PHE+Heparina, y se colocó 2ul de solución de espermatozoides procedentes del epidídimo, que fueron seleccionados y capacitados por el método *percoll* (90%:45%) y luego puestos a cultivar por 18 horas. Después los presuntos cigotos se transfirieron al medio SOF y puestas a incubadora durante 7 días. El porcentaje de clivaje obtenidos a 24h post-cultivo del T1, T2, T3 y T4 fueron  $16.53 \pm 1.33$ ,  $19.92 \pm 0.94$ ,  $21.42 \pm 1.49$  y  $23.90 \pm 2.71\%$  respectivamente ( $P < 0.05$ ). El porcentaje de mórulas obtenidos a los 7 días según los T1, T2, T3 y T4 fueron de  $24.23 \pm 1.71$ ,  $29.49 \pm 1.69$ ,  $35.00 \pm 2.96$  y  $35.30 \pm 2.64\%$  respectivamente ( $P < 0.05$ ), el porcentaje de blastocistos obtenidos según los T1, T2, T3 y T4 fueron de  $3.60 \pm 0.67$ ,  $3.25 \pm 0.82$ ,  $4.52 \pm 0.99$  y  $6.34 \pm 0.85\%$  respectivamente ( $P > 0.05$ ), y el porcentaje de embriones según los T1, T2, T3 y T4 fueron de  $28.34 \pm 1.66$ ,  $32.74 \pm 1.02$ ,  $39.51 \pm 2.98$  y  $41.64 \pm 3.14\%$  respectivamente ( $P < 0.05$ ), obteniendo mayor porcentaje de embriones en el tratamiento T4 y T3. El porcentaje de calidad de embriones de excelente, buena, mediana y mala fueron en **T1**: 15.66, 8.91, 3.27 y 0.50%; **T2**: 19.19, 12.25, 0.91 y 0.45%; **T3**: 28.73, 8.94, 0.33 y 1.51%; **T4**: 29.26, 7.22, 1.61 y 1.94% respectivamente. Se concluye que es importante la suplementación de agentes capacitantes como PHE mas heparina en el medio de fertilización, para aumentar la tasa de producción *in vitro* de embriones de excelente calidad.

**Palabras clave:** PHE, heparina, clivaje, mórulas, blastocistos, embriones.



## INTRODUCCIÓN

Los Camélidos Sudamericanos (CSA) constituyen la mayor riqueza pecuaria y genética de las poblaciones andinas de Sudamérica. Las especies domésticas, alpaca y llama, son fuente de fibra, carne, y de subproductos como pieles y cuero que tienen múltiples usos industriales y artesanales, y que son indispensables para la subsistencia de un amplio sector de estas poblaciones (Fernández-Baca, 2005).

Los CSA han ocupado un papel fundamental en el desarrollo de las sociedades andinas desde las antiguas comunidades de cazadores hasta las actuales comunidades campesinas (Mengoni, 2008). La población nacional de camélidos sudamericanos en Perú es de 3 685 516 de alpacas (INEI, 2012), que es una fuente de riqueza de nuestro país. Las deficiencias en los esquemas de manejo reproductivo han contribuido a un deterioro de la calidad de los animales (Huanca, 2012).

El desarrollo de tecnologías reproductivas como la inseminación artificial (IA), transferencia de embriones (TE) y fecundación *in vitro* (FIV), se presentan como importantes alternativas para contribuir a mejorar la calidad genética en un menor tiempo. La técnica de fertilización *in vitro* (FIV) es una de las tecnologías de mayor desarrollo en los últimos años (Huanca, 2012) e involucra el control de los mecanismos de maduración e interacción de los gametos femenino y masculino en un ambiente artificial (Filipiak y Larocca, 2010).

El desarrollo de protocolos de FIV deberán ser una de las prioridades de investigación, en forma sistemática y conjuntamente con la transferencia de embriones permitirán contribuir a diseñar alternativas tecnológicas para los programas de mejoramiento genético en los camélidos domésticos y en base a los resultados obtenidos, evaluar la posibilidad de su aplicación en camélidos no domésticos (Del Campo y col., 1994).

La fecundación *in vitro* (FIV) es el procedimiento por medio del cual los ovocitos maduros son cultivados junto con espermatozoides y de esta forma son fecundados, para esto los espermatozoides deben ser sometidos previamente a un proceso de preparación *in vitro* con el objetivo de iniciar su capacitación y desencadenar la reacción acrosómica (Palma 2001).

Aunque la suplementación del medio de fecundación con penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE) es una práctica habitual en muchos laboratorios, los estudios realizados para evaluar su acción sobre la fecundación no son abundantes. En el bovino, el primer trabajo sobre el efecto de la penicilamina, la hipotaurina y epinefrina en el medio de fecundación fue realizada con espermatozoides epididimarios por Ball y col, (1983), quienes observaron que la adición tanto de hipotaurina y epinefrina como de PHE mejoraba resultados de fecundación.

En procedimientos de fecundación *in vitro*, la fertilización de los ovocitos madurados debe ser con espermatozoides viables y con alta capacidad fecundante, pero estas cualidades de los espermios no son suficientes con los diferentes procesos de selección que se realizan; tal es la razón por el cual el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo:

### **Objetivo general**

Evaluar los efectos de la suplementación de dos agentes capacitantes en el medio de fertilización para la producción *in vitro* de embriones en alpacas (*Vicugna pacos*).

### **Objetivos específicos**

1. Evaluar la calidad y cantidad de embriones suplementados con Heparina.
2. Evaluar la calidad y cantidad de embriones suplementados con PHE (penicilamina, hipotaurina y epinefrina).
3. Evaluar la calidad y cantidad de embriones suplementados con PHE (penicilamina, hipotaurina y epinefrina) y heparina.

## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1.1. ANTECEDENTES DE AGENTES CAPACITANTES EN ESTUDIO

Se reportaron los efectos de diferentes concentraciones de penicilamina, hipotaurina, y epinefrina (PHE), así como el tiempo de incubación de motilidad, hiperactividad y acrosoma reacción (AR) de espermatozoides *in vitro* de cerneros. Los espermatozoides recién eyaculados de tres cerneros fueron recolectados, agrupados y sometidos a la técnica de Swim up en medio Tyrode's, (piruvato-lactato-albúmina) suplementado con diferentes concentraciones de PHE (10, 20, 30, 40, 50, 75 y 100 mM / ml); donde las altas concentraciones de PHE (30, 40, 50, 75 y 100mM / mL) mostró un aumento significativo en la motilidad en comparación con el control de inmediato después de la dilución y existen para la primera y segunda hora del período de incubación. Y hubo un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) en las tasas de penetración 53.85% y fertilización 50.00% de ovocitos ovinos por espermatozoides capacitados previamente con PHE 75 mM/mL en comparación con el control (El-Shahat y col., 2017).

En un estudio se evaluó el efecto del cultivo *in vitro* e *in vivo* de los cigotos de alpacas producidos *in vitro*. Los ovocitos procedentes de alpacas beneficiadas en el camal y fueron madurados en TCM 2520, suplementado con 2.2 mg/mL de bicarbonato de sodio, 0.0028 mg/mL de piruvato de sodio, 10% de suero fetal, 2 U.I./mL de gonadotropina coriónica equina, 10 U.I./mL de gonadotropina humana más 50 ug/mL de gentamicina y fueron cultivados a 38.5°C, bajo 5% de CO<sub>2</sub>, y alta humedad por 36 h. La fertilización se realizó en FERT TALP (10 ovocitos/gota) donde 10 min antes de la inseminación se suplementaron a la gota de fertilización 2 uL de la mezcla (500 uM de penicillamine, 250 uM de hipotaurina, 500 uM de epinefrina (Leibfried y Bavister 1982), 10 ug/mL de heparina (Conde y col. 2008) y 2 uL de la concentración de espermatozoides. Se incubaron por 24 h a 38.5°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, posteriormente cultivo en medio SOFaa. Los resultados fueron evaluados: A las

120 h de cultivo in vitro post inseminación se observaron 19(17.4%) mórulas y 8 (7.3%) blastocitos y a las 168 h se observaron 18 (16.5%) mórulas y 7(6.4%) blastocitos (**Pérez y col., 2017**).

En la eficiencia de recuperación de embriones de ovulación simple, la calidad de los embriones y la fertilidad de la transferencia embrionaria interespecie. Se utilizaron 9 alpacas donadoras y 40 llamas receptoras. Las donadoras fueron cubiertas mediante monta natural y el lavado de los cuernos uterinos se realizó a los 7 días de la cópula. Las transferencias de los embriones se hicieron en el día 7 (grupo I) y 6 (grupo II) post-inducción de la ovulación con buserelina a las receptoras. Se recolectó el 58.3% de los embriones, donde se recuperaron 57.2, 23.8 y 19.0% de los embriones de grado 1, 2 y 3, respectivamente. No hubo embriones de grado 4. La fertilidad a los 21 días de la transferencia fue de 33.3 y 11.1% para los grupos 1 y 2, respectivamente (promedio: 20.0%), sin registros de mortalidad embrionaria en los controles a los 90 y 150 días de la transferencia (**Pacheco y col., 2016**).

Se reporta, que los ovocitos de llama no requieren de agentes capacitantes (heparina, Penicilamina e Hipotaurina) en los medios de fecundación, ya que no se encontró diferencias estadísticas en la tasa de división embrionaria (2 células) 56% al uso de agentes capacitantes versus 50% de medio control sin capacitantes; asimismo, las tasas de Blastocisto producidos in vitro al día 8 fueron de 35% y 47.4%, respectivamente (**Conde y col., 2008**).

También se reportó, el efecto de la cisteamina en el medio de maduración sobre la tasa de división posfecundación y el efecto de los medios de cultivo KSOMaa y SOF sobre la tasa de desarrollo embrionario in vitro hasta los 8 días posfecundación, donde se colocó 2 µl de la solución de espermatozoides, PHE (Penicilamina [P4875], Hipotaurina [H1384] y epinefrina [E1635]) y heparina 2% en la fertilización. Los resultados de la primera fase indican una tasa de división de 43.6% para el grupo control y 46.0% para el grupo suplementado con cisteamina, sin encontrar diferencia significativa. En la fase 2, se obtuvo una tasa de 18.0% de blastocistos para el tratamiento TCM-199 + KSOMaa y 20.9% para TCM-199 c/ cisteamina + KSOMaa ( $p < 0.05$ ), y 15.8% para TCM-199 + KSOMaa y SOF y 18.7% para TCM-199 c/ cisteamina + KSOMaa y SOF ( $p < 0.05$ ). Los resultados indican que la adición de cisteamina al medio de cultivo mejoró la tasa de

desarrollo embrionario in vitro hasta el estadio de blastocisto en ovocitos madurados en medio TCM 199, no habiendo diferencias por el uso de los medios de cultivo **(Quintanilla y col., 2015)**.

En un estudio, que se evaluó el efecto del tiempo de cultivo sobre la tasa de maduración nuclear y tasa de división posfecundación a 72 horas de ovocitos de alpacas. Los ovocitos fueron distribuidos en cuatro tiempos (30, 34, 38 y 42 h) madurados en TCM-199 suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), 0.5 µg/mL de FSH, 10 µg/mL de hCG, 0.2 mM de piruvato de sodio, 50 µg/mL de gentamicina y 1 µg/mL de E2 y fecundados con espermatozoides obtenidos de epidídimos que fueron capacitados por Percoll, al medio de fertilización se agregó 2 µl de la suspensión de espermatozoides, 2 µl de heparina (1 mg/ml) y 2 µl de PHE (2 mM Penicilamina, 1 mM Hipotaurina y 250 mM Epinefrina). Los gametos fueron co-cultivados por 18 horas a 39 °C con 5% de CO<sub>2</sub> en KSOM suplementado con 10% de SFB, 2 mM de piruvato de sodio y 50 µg/mL gentamicina, y evaluados a las 72 horas. Donde la tasa de división fue 9.5±4.8, 8.1±5.8, 15.6±9.2 y 19.8±8.0% para 30, 34, 38 y 42 h de maduración respectivamente **(Huanca y col., 2014)**.

En un estudio, los efectos de una mezcla de PHE (D- penicilamina 20 µM, hipotaurina 10 µM y 1 µM de epinefrina) y teofilina (2.5 mM) con concentración de espermatozoides (1,2 o 5×10<sup>6</sup> células / ml) en la fertilización y tasas de desarrollo de blastocistos; las altas tasas de escisión (78.3 a 92.4%) y las tasas de desarrollo de blastocisto (31.9 a 62.0%) en el día 7 fueron obtenidos en presencia de PHE y teofilina en medio de FIV con una concentración de espermatozoides de 2×10<sup>6</sup> células / ml usando espermatozoides de 9 toros. Además, el efecto sinérgico de PHE y teofilina en la fertilización normal (2 pronúcleos) se aclaró en 12 h después de la FIV con una concentración de espermatozoides de 1×10<sup>6</sup> células/ml **(Kang y col., 2015)**.

En un estudio para determinar el efecto de la adición de heparina (10 µg/mL) y PHE (10 µM hipotaurina, 20 µM penicilamina, and 2 µM epinefrina) durante la FIV en la calidad y penetrabilidad de espermatozoides en ovocitos bovinos y en posterior desarrollo embrionario; donde la Calidad de espermatozoides, evaluada por la integridad de plasma y membranas acrosomal y función mitocondrial, disminuyó (P <0.05) en presencia de heparina y PHE. En la penetración de ovocitos, la tasa normal de formación pronuclear

y así como el porcentaje de cigotos que presentan más de dos pronúcleos fue 86.2%, 49.5% y 36.7% respectivamente con presencia de heparina y PHE resultando mayor ( $P < 0.05$ ) con respecto al control. No se observaron diferencias en el porcentaje de clivaje entre el tratamiento y el control ( $P > 0.05$ ) con 70.7% y 71.8% respectivamente; sin embargo, la tasa de desarrollo a la etapa de blastocistos entre el control y del tratamiento con heparina y PHE resultó 12.1% y 39.9% respectivamente, habiendo una diferencia ( $P > 0.05$ ). La calidad de los embriones que alcanzó la etapa de blastocistos fue evaluado por contando la masa celular interna (ICM) y trofotodermo (TE) números de células y número total de células; el porcentaje de ICM y las células TE no se vieron afectadas ( $P > 0.05$ ) en presencia de heparina y PHE ( $P < 0.05$ ) (**Goncalves y col., 2013**).

Cuando los espermatozoides bovinos fueron expuestos a 10  $\mu\text{g} / \text{ml}$  de uno de los cuatro GAG (condroitín sulfato, CS, dermatán sulfato, DS, ácido hialurónico, HA, heparina, HP) donde se incubaron a 38,5°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 1h a 5h, la motilidad total (TM), línea recta de la velocidad (VRL) y la velocidad curvilínea (VCL) fueron más altas en los espermatozoides tratados con HP o HA, en relación con el control y los espermatozoides tratados con CS o DS. Para la fecundación in vitro se trataron con 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de GAG durante 1 h. HP (2 $\mu\text{l}$ , concentración final 10 ng/ml) y PHE stock (concentraciones finales: 18,2  $\mu\text{M}$  de penicilamina, 9.1  $\mu\text{M}$  de hipotaurina, 1.8  $\mu\text{M}$  de epinefrina). Además, los espermatozoides expuestos a HP o HA durante 1 h antes de la FIV exhibieron una capacidad de fertilización significativamente mejorada, evaluada por 2 pronúcleos (NP) y velocidades de escisión en 2d. La exposición a estos GAG también mejoró las tasas de división celular (clivaje) al 2do día, donde el grupo HP (87.3%) fue significativamente mayor que el control (75.2%), DS (73.6%), o CS (74.5%) embriones derivados de espermatozoides tratados ( $p < 0.05$ ) y al día 8, la tasa de formación de blastocitos fue significativamente mayor en los grupos tratados con HP (54.1%) o HA (53.0%) en comparación con los grupos control (34.1%), DS (35.8%) o CS (43.9%) ( $p < 0.05$ ), de la misma manera fue mejor la calidad del embrión y aumentó el ICM y el número total de células de blastocistos a los 8 días después de la FIV ( $p < 0.05$ ) (**Kim y col., 2013**).

En un estudio donde se evaluó un nuevo procedimiento de fertilización in vitro (FIV) de ovocitos bovinos, en el cual se omitió la centrifugación de los espermatozoides para los procesos de lavado y selección espermática. El procedimiento consistió en llenar los

pozos interno y externo con 700 µl de medio de fertilización, hasta que el pozo interno quedara cubierto de medio, luego se depositaron 10 CCOs por pozo interno; luego 30 µl de semen previamente descongelado se depositaron en el fondo del pozo externo y se adicionaron a cada gota 2 µl de heparina (concentración final 2 µg/ml) y 2 µl de PHE (2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina y 250 mM de epinefrina, por un periodo de incubación de 16 h. Los presuntos cigotos fueron cultivados por un periodo de siete días con un cambio de medio a las 72h. Como control, se utilizó un gradiente de *percoll* 45-90% para la selección espermática. La tasa de ovocitos divididos fue de (70.8 vs. 73.1) y la proporción de ovocitos que llegaron al estadio de mórula y blastocisto fue de (18.8 vs. 20.3), respectivamente (**Urrego R. y Col., 2008**).

En estudio donde la tasa de segmentación de ovocitos bovinos madurados in vitro se comparó después de la fertilización en 1) Medio TALP solo (control); 2) en TALP + BOEC; **3) en TALP + PHE**; o 4) en TALP + BOEC y PHE. La tasa de escisión global a las 45 h después de la inseminación fue mayor para los embriones en tratamientos 2 (52%), **3 (55%)** y 4 (66%) que para el Tratamiento 1 (32%). Después de 5 días de co-cultivo con BOEC en medio M-199, 21, 28, **25** y 35% de los embriones escindidos en los Tratamientos 1, 2, 3 y 4, respectivamente, desarrollado para la etapa de mórula o blastocisto (**Miller y col., 1992**).

## **1.2. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LAS ALPACAS**

### **1.2.1. Ovarios**

Son órganos pares localizados en la cavidad abdominal. Están fijados al mesovario y envueltos y por la bolsa ovárica. En la alpaca, el ovario mide en promedio 15mm de largo, 12mm de ancho y 09mm de espesor el ovario izquierdo pesa 2,4 – 1,3g y el derecho 1,9- 1.0g. Con la presencia del cuerpo lúteo el peso ovárico se incrementa ya que esta glándula pesa 1,2 a 1,7g lo que representa la mayor proporción del peso total del ovario. (Vilca, 2008)

La presencia de folículos maduros y, sobre todo, de cuerpos lúteos le confiere al ovario un aspecto lobulado. Cada ovario está rodeado completamente por un largo pliegue del mesosalpinx con forma cónica denominado bursa-ovario, cuya porción apical forma un amplio orificio circular que comunica con la fimbria del oviducto (Bravo y col. 2000).

### **1.2.2. Oviductos**

Los dos oviductos (o trompas de Falopio) son tubos delgados de unos 20 cm de longitud. Por ellos desciende el ovulo para encontrarse con el espermatozoide y permite la fecundación. Son conductos sinuosos que llevan el ovocito del ovario respectivo al cuerno del útero, a la vez que sirven como lugar natural donde dicho óvulo puede ser fecundado por el espermatozoide. La porción del oviducto adyacente al ovario se despliega en forma de embudo (infundíbulo). El borde del infundíbulo, en forma de fleco, se llama fimbria. La luz del órgano presenta una mucosa con muchos pliegues, revestido por un epitelio cilíndrico ciliado simple. El resto de la pared comprende una submucosa de tejido conectivo, una capa de músculo liso circular, y superficialmente, otra capa conectiva cubierta de peritoneo (López – Mazza, 2010).

### **1.2.3. Útero**

Será el órgano que aloja al feto durante 11 meses de gestación. Tiene forma de Y en alpacas y está constituido por dos oviductos, cuerpo del útero y cérvix. 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 15cm, el cuerpo izquierdo (donde se desarrolla la casi totalidad de las preñeces) de mayor tamaño que el derecho durante la copula el macho deposita el semen en el útero y los espermatozoides migran de allí hasta el lugar de fertilización (Machaca, 2013).

### **1.2.4. Cérvix**

Es una estructura con forma de 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 (Chris y Anderson 2015).

### **1.2.5. Vagina y vulva**

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 (Correa y col., 1994).

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 termina 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 (Rev, Inv. Vet. Perú, 2012 citado por Clavón, 2015).

### **1.3. CRECIMIENTO DE OVOCITOS Y FOLÍCULOS**

#### **1.3.1. Ovogénesis**

La ovogénesis es un proceso complejo, regulado por un gran número de factores intra y extra ováricos, desde células germinales hasta ovocitos fertilizables. Las oogonias, que se originan de células germinales primordiales, proliferan por mitosis y forman los ovocitos primarios que son arrestados en el estado de profase de la primera división meiótica. Dentro de los ovocitos primarios, la síntesis y acumulación de ácidos ribonucleicos (ARNs) y proteínas a través de ovogénesis son esencial para crecimiento y maduración del ovocito, y, además, crucial para el desarrollo interno del embrión después de la fertilización (Hillier y col. 2010 y Sanchez y Smitz, 2012).

#### **1.3.2. Diferenciación fetal de las células**

Los ovocitos se originan a partir de células germinales primordiales en el mesodermo extra-embriónico, cuyo desarrollo depende inicialmente de señales derivadas tanto del ectodermo extra-embriónico como del endodermo visceral. Migración, proliferación y colonización de las células germinales primordiales a las gónadas en desarrollo son controlados por muchos factores y dependerá también de la interacción de células germinales primordiales y sus células somáticas circundantes (Sánchez y Smitz, 2012).

Las células germinales de mamíferos no determinan su destino sexual en función de su constitución cromosómica XX o XY. Su destino sexual es dependiente del medio ambiente gonadal en el que se desarrollan. En un testículo fetal, las células germinales se comprometen a un programa de desarrollo espermatogénico durante la vida fetal, a pesar de que no entran en la meiosis hasta la pubertad. En un ovario fetal, las células germinales se comprometen a ovogénesis entrando en profase de la meiosis I (Bowles y Koopman, 2010).

### **1.3.3. Multiplicación celular**

Los ovocitos presentes en el ovario se originan a partir de un número de células germinales primordiales (CGP) que derivan del endodermo del embrión en desarrollo; posteriormente emigran hasta el mesenterio y se exteriorizan en las crestas genitales. Estas células son grandes y poseen un núcleo redondo con uno o varios nucléolos; además, en su citoplasma están presentes pequeñas mitocondrias, túbulos y cisternas del retículo endoplasmático, polirribosomas, complejos de Golgi, microfilamentos, y un número variable de partículas de glucógeno y gotas lipídicas (Picton, 2001).

Las partículas de glucógeno y las gotas lipídicas almacenadas en estas CGP servirán de reserva energética durante la migración hasta las crestas genitales. Inicialmente, el transporte de estas CGP hacia el presunto ovario depende de una transferencia pasiva que ocurre como consecuencia de los cambios que se están produciendo en el embrión en desarrollo. Posteriormente, este transporte es dependiente del movimiento morfogénico y de propulsión de estas células con alta motilidad como respuesta a determinadas sustancias quimiotácticas, como el factor de transformación del crecimiento ( $TGF\beta 1$ ). Una vez establecidas en el ovario primordial, estas células pierden su motilidad y son transformadas en ovogonias, las cuales comienzan a dividirse por sucesivas mitosis, hasta que la última generación de ovogonias entra en meiosis dando lugar a los ovocitos primarios (Picton 2001).

#### **1.3.3.1. Ovogonia**

En el inicio del desarrollo embrionario aparecen las células germinales primordiales. Estas células migran hacia las gónadas y se convierten ovogonias. Las ovogonias experimentan sucesivas mitosis y luego dan lugar a la primera división meiótica que es detenida en el estadio de profase (profase I); de este modo las ovogonias se diferencian a ovocito primario (Gilbert, 2005).

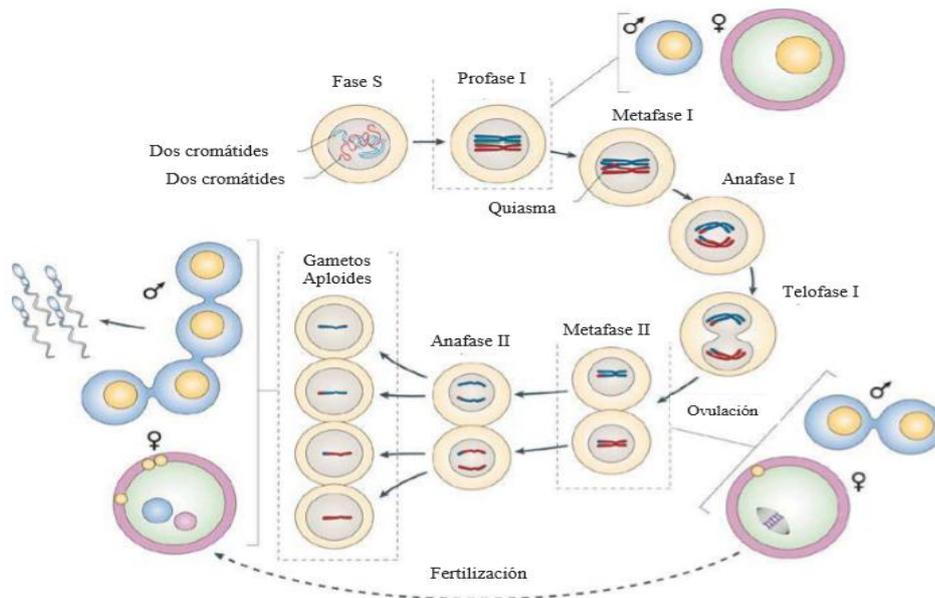
#### **1.3.3.2. Ovocitos primarios**

Las ovogonias se diferencian en ovocito primarios mediante la primera división meiótica, en la que tiene lugar la reducción del número de cromosomas a estado haploide. Este proceso tiene lugar en el folículo primordial en el que se lleva a cabo el primer paso de la meiosis I que incluye la replicación del ADN y el arresto en el estadio de diploteno de la profase I (estado de dictiatio) en lo que se conoce como la primera detención meiótica (Adams y Hertiga, 1964; Jamnongjit y Hammes, 2005).

### 1.3.3.3. Ovocitos secundarios

Este continúa creciendo y aparecen espacios entre las células de la granulosa que van a ser ocupadas por líquido folicular (Palma, 2001)

La primera, división meiótica (reduccional) separa los homólogos (anafase I y telofase I). El resultado es; dos células (o, en hembras, una célula con un cuerpo polar, que se muestra como una pequeña esfera amarilla), estos son los gametocitos secundarios: Cada uno tiene contenido haploide de cromosomas, pero cada cromosoma todavía se compone de dos cromátidas. La segunda división meiótica es ecuacional: En las células germinales masculinas las cromátidas se separan para formar espermátidas inmaduros, cada uno de los cuales contiene el número de cromosomas haploides (1n); en las células germinales femeninas de la segunda división meiótica se produce después de la fecundación, donde el óvulo fecundado contiene dos pronúcleos haploides, uno paterno (azul) y el otro materno (rosado), así como tres cuerpos polares (Handel y Schimenti, 2010).



**Figura 1.1.** Diagrama de meiosis en mamíferos

Fuente: Handel y Schimenti, 2010.

### 1.3.4. 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 pre-ovulatorio (Gigli y col., 2006).

#### **1.3.4.1. 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 (SciELO, 2014 citado por Sorzosa y Culcay, 2014).

#### **1.3.4.2. Folículos primarios**

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 (SciELO, 2014 citado por Sorzosa y Culcay, 2014).

Los folículos primordiales permanecen detenidos en los ovarios hasta su reclutamiento en el crecimiento folicular. Cada día, un grupo de folículos primordiales son reclutados y, estudios morfométricos, sugieren que inician crecimiento en el orden en el que ellos fueron formados (Hirchfiel, 1991). Consecuentemente, son primero transformados en folículos primarios después de pocos días o después de más de un año en roedores y de uno a cinco décadas en mujeres (Salha y col., 1998).

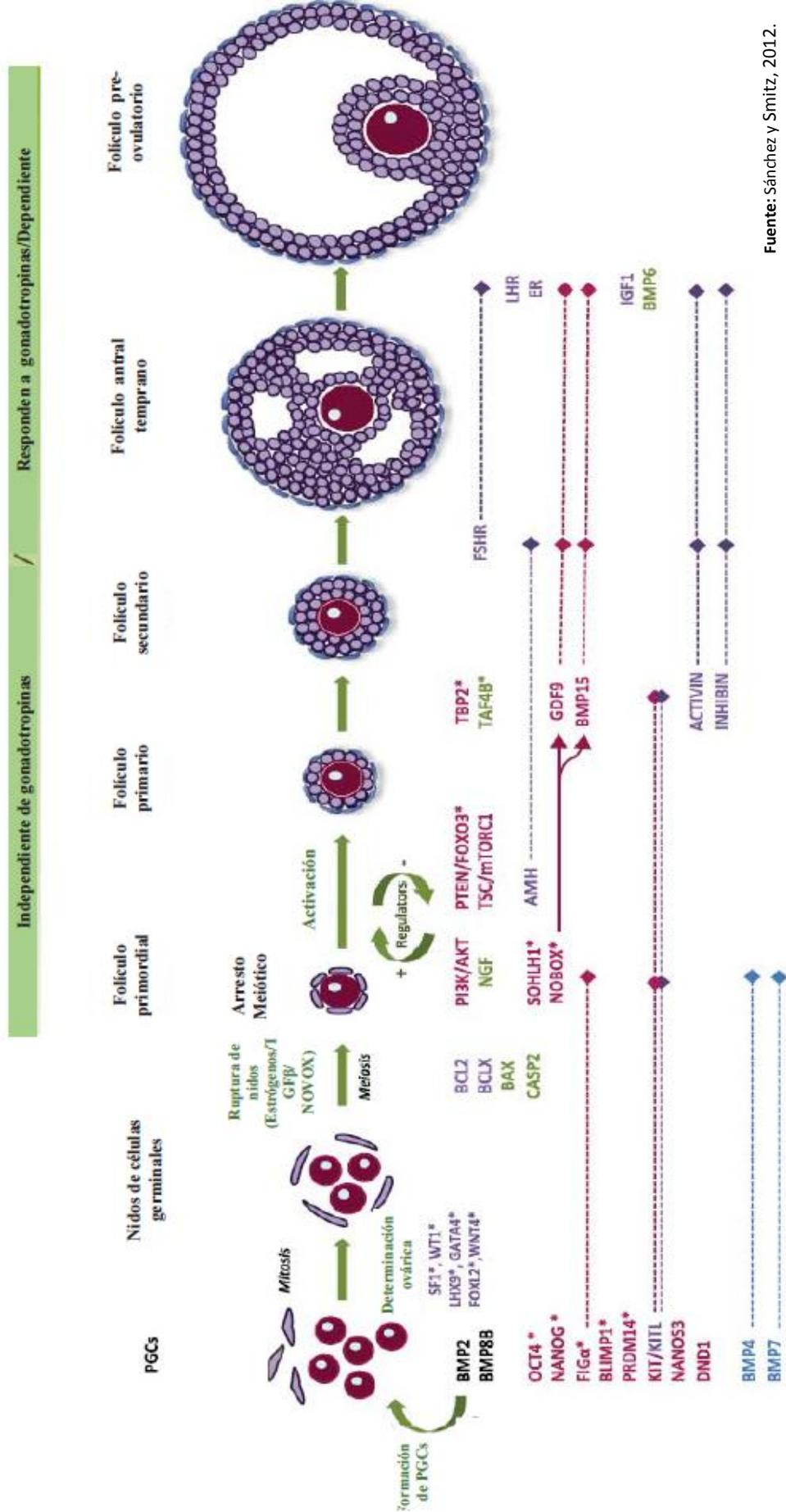
#### **1.3.4.3. Folículo secundario**

En el folículo primario se produce un aumento del volumen del ovocito, sin división celular del mismo, y una hiperplasia e hipertrofia de las células de la granulosa, dando lugar al folículo secundario (un folículo preantral multilaminar). (Hernandez, 2006)

#### **1.3.4.4. Folículo terciario**

Ovocito con células adyacentes forman el cúmulo ovígero. El folículo está ya maduro y listo para que el folículo “estalle” y que el líquido astral arrastre el cúmulo ovígero. 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 (Scribd, 2014 citado por Sorzosa y Culcay, 2014).

**Figura 1.2** Representación de los factores que intervienen en formación de células germinales primordiales (PGC), la ovogénesis y foliculogénesis. Factores ováricos producidos por las células/estroma teca (en azul), las células somáticas/granulosa (en morado), las células germinales (en rojo) o en ambas células germinales y células de la granulosa (verde), ovocitos participan y regulan el desarrollo de los folículos en cada una de las etapas definidas en toda la foliculogénesis. Los factores de transcripción implicados se indican con un asterisco (\*). Las proteínas del ectodermo extra embrionario que participan en la formación de PGC se indican en negro



Fuente: Sánchez y Smitz, 2012.

### **1.3.5. Maduración de ovocitos**

La maduración del ovocito está dividida en maduración nuclear y maduración citoplasmática, hace referencia a todos los cambios nucleares, citoplasmáticos y de membranas que sufre el ovocito, con el fin de prepararse para ser fecundado con éxito y desarrollarse posteriormente. El estímulo que desencadena el inicio de la maduración del ovocito es el aumento preovulatorio de los niveles de gonadotropinas, en especial LH además de la reanudación de la meiosis, el pico de LH desencadena otras transformaciones dentro del folículo como alteraciones en la esteroidogénesis folicular y cambios en el complejo cúmulo-ovocito (COCs), la respuesta inmediata de las células de la granulosa a la interacción con la LH es la activación de la adenilatociclasa y la generación de AMPc. Por tanto, la reanudación de la meiosis viene precedida por un aumento en el AMPc; mismo que desempeña un papel doble en la regulación de la meiosis, por ende los niveles basales de AMPc producidos por las células somáticas en los folículos antrales pequeños son transferidos de manera continua al ovocito, a través de las uniones tipo gap, sin embargo, a partir de la formación de receptores para la LH en las células del cúmulo y granulosa del grupo de folículos dominantes, éstos pueden responder al pico preovulatorio de la LH produciendo grandes cantidades de AMPc (Lars, 2005).

#### **1.3.5.1. Maduración citoplasmática**

En el citoplasma del ovocito se produce una redistribución de las mitocondrias y de los gránulos corticales (GC). Tras la rotura de la VG, las mitocondrias migran para situarse en una posición perinuclear durante la maduración siendo este movimiento mitocondrial necesario para la progresión de la maduración. Los GC son un tipo especial de lisosomas primarios, formados a partir del complejo de Golgi y del retículo endoplásmico, compuestos por glicoproteínas y enzimas hidrolíticas. Los GC migran hacia la periferia del ovocito, aumentan de número al final del periodo de maduración y se sitúan debajo de la membrana plasmática formando una monocapa. Además, la maduración citoplasmática implica una reprogramación de la síntesis proteica, parte del ARNm que había sido almacenado durante la fase de crecimiento comienza a transcribirse, sintetizándose nuevas proteínas que serán esenciales en la progresión de la meiosis, la regulación de la penetración espermática y la descondensación de la cabeza del espermatozoide. (Rahman y col, 2008)

### **1.3.5.2. Maduración nuclear**

El proceso de reanudación de la meiosis está controlado a través de la activación mediante una vía de señal transductora que incluye el MPF. Este factor se activa durante el comienzo de la maduración ovocitaria, al iniciarse la GVBD y aumenta en estadio de MI; posteriormente, su actividad decae en estadio de anafase/telofase I y vuelve a alcanzar un pico en estadio de MII (Wu y col., 1997).

El MPF en forma activa es necesario para la rotura de la VG, la condensación de la cromatina y su actividad alcanza un pico en Metafase I y II, para de crecer en anafase I y II lo que indica que su inactividad también es necesaria para esta progresión, por otra parte la reorganización de los microtúbulos y la apropiada orientación del huso durante la MII parece estar mediada por las MAP kinasas (MAPK), cuya actividad también está inhibida de algún modo por el AMPc y aumenta con la reanudación de la meiosis. A diferencia del MPF, la actividad del MAPK permanece elevada en los estadios de anafase. (Unesur, 2013 citado por Clavón, 2015).

La masa de los cúmulos está compuesta de una parte celular y otra acelular. Esta última contiene proteínas, carbohidratos y ácido hialurónico. La expansión de las células circundantes del folículo preovulatorio es la principal diferencia entre un ovocito preovulatorio y uno no ovulatorio, siendo las células apretadas e invertidas características del primer estadio y las expandidas del segundo (Goto y col., 1990), las células compactas, inactivadas, apretadas y adheridas a la ZP responden a las gonadotropinas y esferoides foliculares, llamándosele a este proceso activación o Dulcificación.

La ZP es una glicoproteína secretada por el ovocito durante su crecimiento, y está compuesta por 70% de proteínas, cuyas mejor conocidas son ZP1, ZP2 y ZP3, 20% de hexosa, 3% de ácido siálico y 2% de sulfato (Dale y Elder, 1997). La integridad de esta zona durante la maduración es importante porque facilita la disponibilidad de nutrientes para este proceso (Zamboni, 1972 citado por Brackett, 1985), aportando principalmente piruvato y oxalacetato. El rompimiento prematuro de esta capa resulta en la muerte del ovocito, ocurriendo esto en los destinados a la atresia.

### **1.3.6. Fertilización in vivo**

La fecundación es la etapa que asegura la formación de un nuevo individuo a partir de dos gametos, uno masculino y otro femenino. Tras la fusión de los gametos, los dos sets de cromosomas haploides se asocian en el huso mitótico y se produce la primera división mitótica embrionaria. Para que este proceso ocurra satisfactoriamente, varios eventos deben producirse: (i) penetración del espermatozoide a través de las envolturas ovocitarias, (ii) interacción del espermatozoide con la ZP, (iii) fusión ovocito-espermatozoide, (iv) activación del ovocito, (v) descondensación del núcleo espermático y formación de los pronúcleos (PN), (vi) desarrollo de los PN masculino y femenino y su migración al centro del ovocito, (vii) asociación de los cromosomas paternos al huso mitótico de la primera división celular (Plachot, 2000).

#### **1.3.6.1. Transporte de gametos**

El desplazamiento del ovulo a partir del sitio de ovulación y de los espermatozoides a partir del sitio de deposición, es una función de los diversos segmentos del aparato reproductor. El espermatozoide es motil y, por tanto, recorre parte del trayecto por su propio impulso. El ovulo, por el contrario, es inmóvil y depende de otras estructuras anatómicas para ser desplazado (Sorensen, 1982).

#### **1.3.6.2. Transporte de gameto masculino**

El espermatozoide es eyaculado como célula adulta. El toro, el carnero y el hombre depositan su semen sobre la cara del cuello uterino y la porción craneal de la vagina. Los espermatozoides penetran por el cuello uterino a través de su propio movimiento, ya que nadan en contra del flujo del moco cervical. La mayor parte de las células permanecen en la vagina y solo un reducido número de ellas alcanza el sitio de la fecundación. Aproximadamente 70 % de los espermatozoides permanecen en la vagina de la vaca; solo un 30% penetra el cuello uterino. La mayor parte de estos últimos se queda en el cuello, pues solo 10 % llega al interior del útero y apenas 1% penetra por cada oviducto (Sorensen, 1982).

Una vez que los espermatozoides pasan el cuello uterino y penetran en el útero, el miométrio se convierte en el principal factor de transporte. Durante el celo, el miométrio se contrae repetidas veces en respuesta a la presencia de estrógenos (Sorensen, 1982). Gracias a las contracciones y a los líquidos, los espermatozoides son

mezclados y enviados hacia el oviducto (Zerobin, K. y col. Citados por Sorensen, 1982). Muchos espermatozoides mueren en el camino, pues penetran en las glándulas endométricas y ahí son fagocitados por los leucocitos que se encuentran en la luz del conducto. En algunas especies, es durante el recorrido de los espermatozoides por el útero cuando ocurre la capacitación (Sorensen, 1982).

En primer lugar, las hormonas esteroides (en particular el estradiol y la progesterona) juegan un papel importante sobre la contracción y secreción oviductal, gracias a los receptores que existen en el tejido del oviducto para estas hormonas (revisado por Harper, 1988).

En segundo lugar, intervienen una serie de sustancias como ciertas catecolaminas (norepinefrina y epinefrina), prostaglandinas (PGF<sub>2α</sub> y PGE<sub>1</sub>), ciertos péptidos (péptido intestinal vasoactivo), nucleótidos cíclicos (AMPc) y neurotransmisores (GABA). Todas ellas controlan, en parte, el transporte de los gametos a través del oviducto (Harper, 1988).

### **1.3.6.3. Capacitación in vivo**

Gonzales, 2001; publica que los espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo o eyaculados no son capaces de fecundar sino después de permanecer algunas horas en las vías genitales femeninas, acumulándose en la unión utero-tubarica y fecundando justo antes de la fecundación, cerca al ovocito. Las condiciones óptimas para que ocurra este evento se dan durante la fase metaestral del ciclo, es decir antes de la ovulación.

Durante la capacitación se incrementa la permeabilidad de la membrana plasmática a los iones como el calcio, se presentan cambios en la composición de lípidos de la misma, y un incremento intracelular del pH; igualmente, se presenta una redistribución de las proteínas de la superficie celular, se incrementa la motilidad espermática y la actividad del AMP cíclico, así como también se incrementa la fosforilación de los residuos de tirosina de la proteína (Visconti y col., 2002; Baldi y col., 2002). Estas modificaciones les confieren a los espermatozoides la capacidad de adherirse a la zona pelúcida, completar la reacción acrosómica e iniciar la fusión con el ovocito (Thérien y col., 1998).

#### **1.3.6.4. Hiperactivación del espermatozoide**

Durante la capacitación, el espermatozoide muestra cambios dramáticos en los patrones de movilidad, descritos como hiperactivación (Velásquez, 2004).

Los cambios producidos en la membrana del espermatozoide durante la capacitación incluyen cambios en las propiedades de las membranas espermáticas, aumento del pH acrosomal (de 7,4 a 7,8), alteraciones en la proporción entre el colesterol y los fosfolípidos, aumento de la permeabilidad a los iones de calcio, interacción con glicosaminoglicanos y, por último, la reacción acrosómica (Yanagimachi, 1988; Fayrer-Hoskens y Caudle, 1991).

#### **1.3.6.5. Reacción acrosómica**

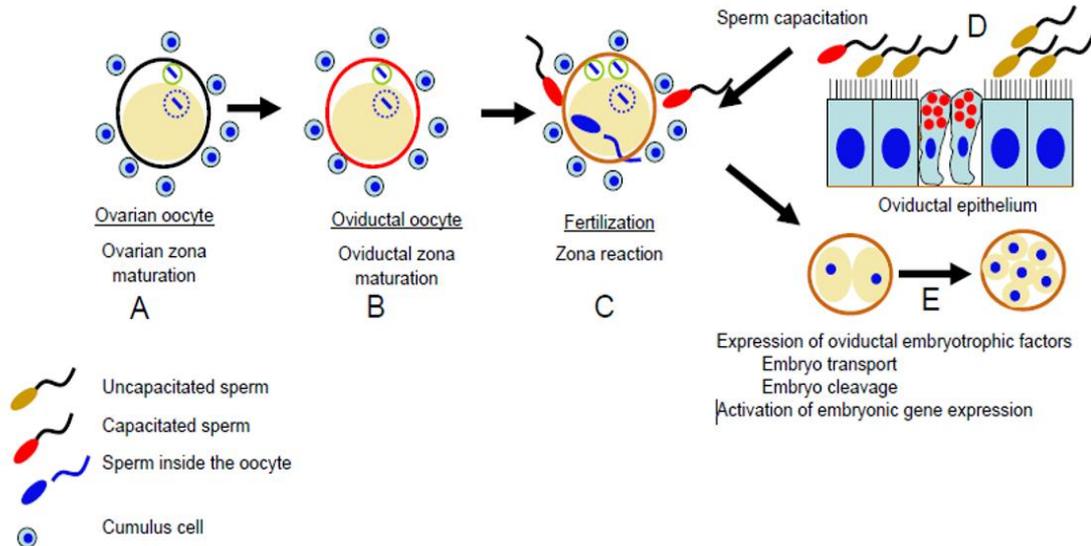
Habiendo pasando por el proceso de unión a la ZP, el espermatozoide es sometido a un proceso denominado reacción acrosómica, el cual, Salgado y col., en el 2005, lo define como la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa.

En el ratón se asume que los polisacáridos de la ZP3 (ZPC) son los responsables de la unión con el espermatozoide. En vaca y cerda la ZP3 $\alpha$  o ZP4 son las que se unen a espermatozoides (Cánovas y Coy., 2008). La reacción del acrosoma se produce por la interacción del espermatozoide con glúcidos de la proteína ZP3 de la zona pelúcida. Posterior a la interacción con la ZP3, ocurre la liberación de varias enzimas acrosómicas y otros componentes como glicoproteínas secretadas por el retículo endoplásmico y aparato de Golgi, que son las enzimas que facilitan la penetración de la zona pelúcida, lo que permite la fusión de la membrana del espermatozoide con el oolema del ovocito.

#### **1.3.6.6. Fecundación**

Para explicar la fusión de gametos, se han propuesto las proteínas de anclaje al ovocito, CD9 y glicosilfosfatidil inositol (GPI) y la proteína epididimal en el espermatozoide, como las moléculas candidatas a ser las responsables de la fusión de las membranas del espermatozoide y del ovocito. Sin embargo, aún no se han podido analizar claramente las interacciones proteína-proteína en esta fusión. Zhou y col. (2009), demostraron que la proteína CD9, miembro de la superfamilia de proteínas tetraspaninas, presentes en ovocitos maduros de bóvidos, está involucrada en la interacción espermatozoide-ovocito durante el proceso de fecundación, interviene en la fusión de membranas del

ovocito y el espermatozoide, del que se libera una molécula de superficie que parece ser una proteína de 30-100 kDA llamada “oscilina” o factor espermático, que activa al ovocito, produciendo la liberación del  $Ca^{2+}$ , almacenado en el espermatozoide, en forma de onda.



**Figura 1.3** Eventos producidos durante la fecundación, en las diferentes regiones anatómicas del oviducto.

Fuente: Tomado de Avilés y col., 2010. Mol. Hum. Reprod

## 1.4. DESARROLLO EMBRIONARIO

### 1.4.1. Segmentación o división celular

Poco después de la fecundación, el cigoto comienza a dividirse a la vez que va recorriendo el oviducto hacia el útero, esto último facilitado por la acción de los esteroides. Los cigotos sufren la primera división celular aproximadamente a las 17-19 horas tras la ovulación (Hunter, 1990). Los embriones mantienen el estadio de 2 células durante 6-8 horas mientras que el estadio de 4 células se prolonga durante 20-24 horas (Flint, 1981), por lo que la mayoría de embriones entran en este estadio en el útero. Durante este proceso, la división se produce sin que aumente la masa celular, a diferencia de las mitosis de las células somáticas.

El estadio de mórula (8-16 células) en la especie porcina se alcanza alrededor del día 4, tomando como día 0 el momento de la ovulación (Hunter, 1990). Durante el proceso de división, las organelas citoplasmáticas son escasas y están concentradas alrededor del núcleo, mientras que las inclusiones de vitelo llenan las zonas periféricas del citoplasma. Las mitocondrias se elongan en el estadio de mórula, lo que sugiere un

incremento en su actividad metabólica. Los nucléolos se observan a partir de estadía de 8 células y éstos se asocian a un incremento en el número de ribosomas.

#### **1.4.2. Formación de blastocistos**

Tan pronto como el embrión llega a 16 células (dependiendo de la especie), los blastómeros empiezan a formar uniones estrechas unas con otras adoptando una forma circular ligeramente lobulada denominada mórula. Cuando la mórula está formada, los blastómeros empiezan a separarse en 2 poblaciones distintas: las células internas y las externas. Las células de la posición interna desarrollan uniones tipo gap, que por un lado permiten la comunicación intercelular y, por otro, van a mantener agrupado a este conjunto celular. Las células externas van a desarrollar uniones estrechas, que se producen para modificar las características de permeabilidad. Después de que se hayan formado las uniones estrechas, los fluidos empiezan a acumularse en el interior del embrión. Esta etapa, en la que el embrión aún se encuentra rodeado por la ZP, recibe el nombre de blastocisto y en él se diferencian según su posición dos poblaciones de células: una interna (masa celular interna) que dará origen al embrión propiamente dicho, y otra, la situada periféricamente, que origina el trofoectodermo o trofoblasto, que interviene en la ingestión selectiva de nutrientes y formará posteriormente el corion (Hafez, 2000).

### **1.5. PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES**

La finalidad de un ciclo de FIV es conseguir embriones de buena calidad, que implanten y se desarrollen dando lugar a un nacimiento viable. Los ovocitos, tras ser fecundados mediante FIV o ICSI, se cultivan en el laboratorio bajo estrictas condiciones de humedad, temperatura y esterilidad. Desde los comienzos de las TRA los medios de cultivo han evolucionado mucho, y hoy en día son altamente complejos y se diseñan basándose en las secreciones del tracto genital femenino (Lobo 2003).

Los trabajos históricos realizados por Pincus y Enzmann en 1935, han sido los primeros en intentar reproducir un medioambiente extracorpóreo capaz de mantener óvulos. De acuerdo a los trabajos de revisión realizados por Van Soom y Kruif (1996) y Yang y col. (1998) a través de los años, se han desarrollados diferentes sistemas capaces de permitir la maduración y fertilización *in vitro* de los ovocitos y el desarrollo *in vitro* de cigotos y embriones.

### **1.5.1. Obtención de ovocitos (cúmulos-ovocitos)**

Para la obtención de ovocitos en las diferentes especies, existen técnicas utilizadas ya desde mucho tiempo, principalmente usadas en la especie bovina de donde se traspolaron a las distintas especies de producción. Se detalla las técnicas más usadas:

#### **1.5.1.1. Aspiración folicular**

Es el método más utilizado por la rapidez del procedimiento, además de permitir seleccionar los folículos de tamaño concreto (Gordon, 1994). El método de aspiración, consiste en la succión de los folículos situados en la superficie del ovario por medio de una aguja.

El diámetro de la aguja utilizada es considerado importante a efectos de no dañar los ovocitos recogidos (Fry y col., 1997), en alpacas se utiliza una jeringa de 10 mL con una aguja de 21 G x 1 ½ pulgadas (Gómez y col., 2002); o con una jeringa de 10 mL esteril y aguja 18G1 ½ (Huanca y col., 2014) y para luego ser colocadas en un medio de lavado mientras.

#### **1.5.1.2. Slicing**

Permite obtener un gran número de ovocitos por ovario, pero al provenir de folículos de diversos tamaños y grados de atresia pueden tener una calidad muy variable (Martino y col., 1995), por lo que se requiere una selección estricta de los ovocitos.

El método de slicing folicular (insición de la superficie del folículo del ovario) los ovarios son fijados a una pieza hemostática curva para luego, utilizar un bisturí, seccionar longitudinal y transversalmente todos los folículos visibles de 2 a 6 mm (Gomez y col., 2002).

#### **1.5.1.3. OPU**

Técnica de punción ovárica guiada por ultrasonografía u Ovum Pick-Up (siglas en inglés, OPU), es una técnica ampliamente utilizada como herramienta para estudiar la dinámica folicular y registrar la capacidad de repetición y la previsibilidad de ondas foliculares. Además de su uso práctico, la OPU ofrece un sistema excelente para estudiar la maduración del ovocito in vivo o in vitro recuperados bajo varias condiciones fisiológicas (Yang y col., 1998b).

#### 1.5.1.4. Disección folicular

Disección de los folículos (Staigmiller y Moor, 1984), esta técnica permite identificar los folículos no atrésicos. Diversos estudios han demostrado que el diámetro folicular está relacionado con la capacidad del ovocito de madurar, ser fecundado y desarrollarse in vitro. Yang y col. (1998), en su estudio sobre el control de la maduración de ovocitos de vaca, sugieren que la tasa de maduración, división y desarrollo embrionario son significativamente menores en los ovocitos provenientes de folículos pequeños (<2 mm) que los provenientes de folículos medianos (2-5 mm) y grandes (5-8 mm).

#### 1.5.2. Selección de ovocitos

La selección de los ovocitos que se pondrán a madurar es fundamental para la eficacia del proceso. Dicha selección se basa normalmente en criterios morfológicos, en función del tamaño y color del ovocito, el aspecto compacto, el número de capas de células de los cúmulos y homogeneidad del citoplasma (Otoi y col., 1995).

En camélidos se consideraron como aptos cuando tienen 2 o más capas de células de la granulosa rodeando al ovocito y con un citoplasma de color homogéneo, siendo descartados los ovocitos con cúmulo expandido, parcial o totalmente desprovistos de células de la granulosa (Ratto y col., 2005).

Hay muchos estudios que categorizan a los ovocitos según la morfología, el tamaño, los aspectos y el color del citoplasma, cumpliendo la capacidad de ser viable y cultivados en un medio de maduración in vitro.

**Tabla 1.1.** Categorización de ovocitos

Categoría	Características
1	COCs con 5 o más capas compactas de células del cúmulo y con citoplasma homogéneo.
2	COCs con 2-4 capas compactas de células del Cúmulo y citoplasma homogéneo.
3	1 capa o menos de células de la granulosa o parcialmente desnuda y/o citoplasma vacuola
4	Ovocito desnudo y/o citoplasma granular.

Fuente: (Ratto, 2005)

### **1.5.3. Factores importantes para la producción *in vitro* de embriones**

#### **1.5.3.1. pH y osmolaridad**

El pH del medio debe mantenerse cercano al del plasma sanguíneo (pH 7,4), de ahí la importancia del bicarbonato que actúa como sustancia buffer y además como nutriente esencial (Palma, 2001). El rango óptimo de la osmolaridad debe oscilar entre 285 y 320 mOsm/kg (Urdaneta, 2005).

#### **1.5.3.2. Temperatura**

Se debe mantener igual o aproximada a la temperatura corporal fisiológica de la especie a la que pertenecen los ovocitos, 38,5 °C para los bovinos (Gordon, 1994).

#### **1.5.3.3. Atmósfera**

La atmósfera es importante para el funcionamiento fisiológico normal de las células y para mantener constante el pH del medio. Un 5% CO<sub>2</sub> en aire saturado de humedad, proporciona óptimas condiciones para que los procesos de MIV y FIV tengan lugar en condiciones adecuadas (Bavister y Rose-Hellenkant, 1992).

#### **1.5.3.4. Hormonas**

La suplementación de los medios de maduración con hormonas, se basa en el importante rol de las gonadotropinas luteinizantes (LH) y folículo estimulante (FSH), en el desarrollo folicular y del ovocito *in vivo* (Palma, 2001).

### **1.5.4. Maduración *in vitro* de ovocitos**

En 1965, Edwards demostró la capacidad de los ovocitos humanos para madurar *in vitro* cuando eran aislados de los folículos y cultivados en un medio apropiado. Los ovocitos utilizados para la MIV pueden ser obtenidos a partir de hembras vivas o a partir de ovarios de hembras sacrificadas en matadero.

A pesar de que los ovocitos madurados *in vitro* muestran tasas de maduración nuclear, fecundación y división embrionaria similares a los ovocitos madurados *in vivo*, su capacidad de desarrollo es significativamente inferior. Mientras que el 85% de los ovocitos madurados *in vivo* son capaces de ser fecundados y dar origen a un embrión, solo un tercio de los ovocitos madurados *in vitro* obtienen esa capacidad. Esta diferencia se debería fundamentalmente al origen de los ovocitos (Blondin y col., 2002).

#### **1.5.4.1. Medios de maduración**

En Camélidos Sudamericanos el medio de cultivo usado con éxito es el Tissue Culture Medium-199 (TCM-199), con el ion híbrido (2-[4-(2hidroxietil) piperazin-1-il] ácido etanosulfónico: HEPES) y bicarbonato, como estabilizadores de pH, y suplemento con piruvato lactato, vitaminas, aminoácidos, proteína y suero fetal bovino (Palma, 2001).

Sansinema y col., (2003) para la MIV de COCs de llama introdujeron LH en su protocolo de maduración, así el medio de MIV estuvo compuesto por TCM-199, 5 µg/ml de FSH, 10 µg/ml de LH, 1 mg/ml de estradiol 17β y 10% de suero fetal bovino, y obtuvieron 52% de ovocitos en MII. Posteriormente Sansinema y col., (2007) utilizó un medio diferente para la MIV consistente de TCM-199, 5 µg/ml de FSH, 10 µg/ml de LH, 10 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de IGF-1 y 1µg/ml de estradiol 17β y 10% de suero fetal bovino, mejorando su anterior resultado con 74% de ovocitos en MII luego de 30 horas de MIV.

Ruiz y Correa (2007) maduraron ovocitos de alpaca y llama durante 27 y 30 horas respectivamente en TCM-199 suplementado con piruvato de Na 0,2 mM, sulfato de gentamicina 50 µg/ml, FSH 0,02 unidades/ml, estradiol 17-β 1µg/ml y suero fetal bovino al 10%, obtuvieron 75% y 100% de ovocitos en MII de llama y alpaca respectivamente.

Con respecto al tiempo óptimo para la MIV, Ratto y col. (2005) indican que no existen diferencias significativas entre 28, 30 y 36 horas para la MIV de ovocitos de llama, sin embargo, Ayuque y col., (2014) encontraron que se requieren por lo menos 36 horas de MIV para la producción de embriones de llama producidos por FIV, en un estudio en el que evaluaron 30, 36 y 42 horas.

#### **1.5.5. Fertilización *in vitro* de ovocitos**

En condiciones *in vivo*, la fecundación del ovocito ocurre cuando la relación espermatozoide: ovocito es cercana a 1:1 (Frei, 2004), en contraste con la situación *in vitro*, donde la concentración de espermatozoides utilizada permite obtener una relación de 10.000:1 (Ward y col., 2002). Los ovocitos incubados con una alta concentración de espermatozoides en un volumen relativamente reducido de medio de fecundación, están expuestos a la acción de las enzimas hidrolíticas liberadas por los espermatozoides

muertos, lo que puede tener un efecto perjudicial en su potencial desarrollo, por lo que la duración de co-cultivo de los gametos no debería de sobrepasar el tiempo necesario para que se produzca la máxima penetración (Gordon, 1994).

El medio y los protocolos utilizados para la producción de embriones son diferentes de un laboratorio a otro y son la principal fuente de la variación de los programas de FIV (Nedambale y col., 2006a). Los medios de fecundación in vitro han sido formulados con el propósito de favorecer las condiciones para la capacitación espermática y la fecundación de los ovocitos madurados (Nedambale y col., 2006).

La fecundación in vitro se ha definido como la penetración de espermatozoides con capacidad de fecundar en oocitos maduros fuera del genital femenino (Lopera, 2009). En la fecundación in vitro se busca imitar mediante técnicas y protocolos las condiciones y los eventos que suceden fisiológicamente en la región ampular del oviducto, específicamente la interacción entre gametos y la formación de pronúcleos y singamia (Greve y Madison, 1991).

#### **1.5.5.1. Medio de fertilización**

Palma en 2001, propuso la utilización de TL- stock 10 ml, BSA 60mg y Piruvato stock. En los rumiantes los medios de capacitación y fecundación más utilizados son el medio Tyrodes suplementado con albúmina, lactato, piruvato (TALP; Vieira y col., 2002; Pereira y col., 2005; Lima y col., 2006; Sagirkaya y col., 2007).

#### **1.5.5.2. Relación ovocito/espermatozoide en el cultivo**

La relación ovocito/espermatozoide es importante en la fertilización in vitro. De este modo, ha podido establecer que, si el número de células espermáticas es demasiado bajo en relación con el número de ovocitos, obtendremos pobres resultados de fertilización; si, por el contrario, el número de células espermáticas es demasiado alto se producen fenómenos de poliespermia (Saeki y col., 1995).

Independientemente del medio de fertilización utilizado, la mayor parte de los protocolos de fertilización in vitro, utilizan entre 0.5 y 1.5 x 10<sup>6</sup> células espermáticas/ml y el co-cultivo con los ovocitos madurados in vitro, se lleva a cabo en microgotas de 50 ml, que contienen entre 5 y 40 ovocitos (Ling y Lu, 1990; Saeki y col., 1995). Referente

al número de ovocitos, Ling y Lu, (1990) emplean hasta 50 ovocito por cada microgota de 50 ml de inseminación. Sin embargo, la proporción de blastocistos obtenidos disminuye si la concentración espermática es superior a  $1.6 \times 10^6$  células /ml. En un estudio realizado por Ayuque y col., (2014), utilizaron  $3 \times 10^6$  espermatozoides vivos / ml (Concentración final en la gota).

#### **1.5.6. Selección de espermatozoides**

El fenómeno de capacitación de espermatozoides de los mamíferos fue descubierto por MONROY. Se trataba de un concepto nuevo y sorprendente a la vez, en tanto demuestra que los espermatozoides tienen que completar el proceso de madurez (capacidad fecundante) en el aparato genital femenino de la hembra respectiva, mediante un tiempo de permanencia en contacto con la mucosa uterina cifrado en 2-6 horas, dependiendo de la especie. Tras la referida permanencia capacitadora, los espermatozoides adquieren la facultad de fecundar al ovocito tanto in vivo como In Vitro (Pérez y Pérez, 1985).

La presencia de plasma seminal es considerada beneficiosa para la función espermática pero perjudicial para la sobrevivencia espermática. Es conocido que el plasma seminal contiene muchos factores que ayudan la permanencia de la función espermática, por ejemplo, los factores de-capacitadores (Pérez-Pé 2001 y Björndahl y col., 2005). Pero también otras sustancias, por ejemplo, factores que inhiben la motilidad (Kordan y col., 1998), que tienen un efecto restrictivo sobre el movimiento espermático in vitro, y especies oxígeno reactivas (ROS) que son perjudiciales para su prolongada sobrevivencia (Hammadeh y col, 2008). ROS son producidas por leucocitos y restos celulares, más importante, para muchos animales machos (restos citoplasmáticos en espermatozoides inmaduros, o por espermatozoides muertos o dañados). Altos niveles de ROS son asociados con infertilidad en humanos (Aitken y Clarkson, 1987), los bajos niveles son considerados prerequisite para la ocurrencia de cambios en la membrana antes de la fertilización (Aurich, 2005; Morte y col, 2008). Es así que, las tasas de fertilización in vitro de porcinos pueden ser mejoradas por la reducción de los niveles de ROS usando superóxido dismutasa o catalasa (Roca y col, 2005).

Según Yanagimachi, y col; citados por Pérez y pérez, 1985; la eliminación de tales factores inhibidores es lo que permitirá la fijación de los iones calcio sobre la membrana

espermática, fijación que inducirá los cambios de motilidad e iniciará el proceso de reacción acrosómica.

### **1.5.7. Métodos de selección y capacitación de espermatozoides**

Existen varios métodos para la selección de espermatozoides y la escogencia de uno de estos depende no sólo de la obtención de espermatozoides móviles, sino también de la complejidad de la técnica, el material, equipo requerido, el tiempo y los costos (Mortimer, 1997).

#### **1.5.7.1. Método *percoll***

En este método los espermatozoides se seleccionan en virtud de su velocidad potencial y su relativa alta densidad. El semen, diluido en medio de capacitación, es colocado en la parte superior del *percoll*, el cual posee una concentración diferencial de 45 y 90%, procediéndose luego a su centrifugación, obteniendo espermatozoides viables concentrados en el fondo, quedando en las fases del gradiente los espermatozoides muertos o de baja movilidad, el plasma seminal y demás estructuras (Dode y col., 2002; Kochhar y col., 2003; Parrish y col., 1995).

La técnica de preparación de semen bovino a través del gradiente diferencial de *percoll*® no altera ni la integridad de la membrana plasmática ni del ADN bajo unas condiciones de 10 minutos de centrifugación a 700 x g, por lo que se sugiere la utilización de este protocolo para la preparación espermática previo a la fertilización al no tener efectos deletéreos sobre la membrana plasmática y sobre el ADN; y podría evaluarse las tasas de división a dos células(cleavage) y blastocistos, utilizando dicho protocolo (Ángel y col., 2009). Sin embargo, en sistemas de producción de embriones in vitro bovino, tratamientos con *percoll* sobre espermatozoides descongelados, fueron causantes de bajas tasas de clivaje y blastocistos, debido probablemente a la polivinilpirrolidona (PVP) libre en el *percoll* (Avery y Greve, 1995). De similar manera Chen y Bongso (1999) indican que el problema es, que algunos lotes de *percoll* tienen efectos endotóxicos, razón por la que fueron descartados para el uso en técnicas de reproducción asistida humana.

#### **1.5.7.2. Método *Swim-up***

Esta técnica fue desarrollada por Parrish y col., (1984), en esta se seleccionan los espermatozoides en virtud de su movilidad intrínseca; para ello, el semen es depositado

en el fondo de un tubo de ensayo con el medio adecuado y se incubaba por espacio de una hora. Desde su inicio, el procedimiento sufrió una serie de variantes a fin de mejorar su eficiencia cualitativa y cuantitativa. Los espermatozoides obtenidos después del tratamiento son altamente móviles (buena calidad), sin embargo, el rendimiento cuantitativo es bajo, lo que puede constituir una desventaja, porque puede requerir el uso de más de una pajuela de semen (Palma, 2001).

Esta selección se basa en la capacidad de los espermatozoides a ser móviles y, como tal, no proporciona ninguna selección basado en la morfología normal de la cabeza, la integridad de la cromatina (espermatozoides con cromatina intacta), o la viabilidad e integridad acrosomal (Somfai y col., 2002).

### **1.5.7.3. Método Washin**

El lavado del semen mediante la sedimentación por centrifugación de los espermatozoides y su re-suspensión en un nuevo medio, es considerado como el método más rápido y eficaz para la eliminación de materiales indeseados (Gordon, 1994).

Si bien los espermatozoides se separan de manera efectiva de la mayoría de los componentes de plasma seminal del eyaculado (Björndahl y col., 2005; Hunter y Rodríguez-Martínez, 2004), no hay ninguna selección de fuentes potenciales de especies oxígeno reactivos (ROS) en el plasma seminal, perjudiciales para la viabilidad del esperma. Debido a esta técnica se han reportado daños de la cromatina, al menos para los espermatozoides humanos (Mortimer, 2000); aunque esto puede ser más debido a la centrifugación de semen en ausencia de antioxidantes, que a la técnica en sí. Dilutores en semen animal, especialmente de leche o dilutores a base de yema de huevo, por lo general contienen algunos antioxidantes que pueden mitigar el efecto del aumento de la liberación de ROS durante la centrifugación del semen. Sin embargo, los resultados de centrifugación en un pellet de esperma contienen células muertas, moribundas y anormales, así como espermatozoides viables (Hallap y col., 2004), ya que todos los espermatozoides de la muestra original se concentran en este.

### **1.5.8. Agentes capacitantes de los espermatozoides**

No se conocen las condiciones o factores que desencadenan y controlan directamente la capacitación del espermatozoide en el tracto genital femenino. Pero si se sabe que hay

ciertas enzimas tales como  $\beta$ - glucoronidasa, proteasas y neuroaminidasas, arisulfatasa, fucosidasa y acetilhexosaminadosa, anhidrasa carbónica y otras sustancias como esteroides sulfato, glicosaminoglicanos, catecolaminas, taurina e hipotaurina, implicadas en la misma (Quintero, 2003).

Después de seleccionar los espermatozoides más móviles mediante algunas de las técnicas mencionadas anteriormente, muchos laboratorios utilizan algún agente químico para estimular y mantener dicha motilidad. La cafeína (Nedambale y col., 2006) y la mezcla de penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE) son los más empleados (Gordon, 1994). El uso de estas concentraciones de espermatozoides tiene una influencia significativa en la proporción de ovocitos que se unen con los espermatozoides, se segmentan y alcanzan el estado de blastocisto (Ward y col., 2002).

#### **1.5.8.1. Heparina**

Los glicosaminoglicanos GAG, como heparina, en el medio, favorecen la capacitación espermática y la reacción acrosómica in vitro, porque ayudan a remover componentes del plasma seminal ubicados en la superficie espermática (Gordon, 1994). 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.

La heparina es el GAG más potente a la hora de inducir la capacitación en espermatozoides bovino (Dapino y col., 2006). En esta especie, la heparina se une a la membrana mediante una unión del tipo ligando-receptor probablemente mediante proteínas de unión de la membrana procedentes del plasma seminal, reduciendo la actividad de la calcio-ATPasa y permitiendo la entrada de calcio extracelular.

La heparina se ha usado para estimular la capacitación de espermatozoides de vacuno in vitro (Parrish y col., 1988) y se han publicado efectos sinérgicos entre la cafeína y la heparina para inducir la capacitación en espermatozoides de toro (Niwa y Ohgoda, 1988). Sin embargo, Kim y col. (1997) no encontraron que la heparina mejorara la penetración in vitro de ovocitos porcinos con semen congelado eyaculado e incluso Wang y col, (1991) mostraron que la heparina inhibe la eficacia de la cafeína en

promover la penetración de ovocitos porcinos. Por tanto, a diferencia del bovino, Kim y col. (1997) han sugerido que el glicosaminoglicano tipo heparina podría no ser un componente de la secreción oviductal implicado en la capacitación espermática en el cerdo ya que la adición de heparina al medio de FIV incrementa la reacción acrosómica, pero no el grado de capacitación espermática.

#### ❖ **Mecanismo de acción en capacitación de espermatozoides *in vitro***

Sierra y Olivera, 2000; postula que los GAGs como la heparina modulan la capacitación uniéndose y removiendo proteínas de la membrana espermática que se cree actúan inhibiendo la capacitación. La heparina puede aumentar la síntesis de AMPc, elevar el pH y aumentar la fosforilación de tirosinas proteicas; el mecanismo y la relevancia fisiológica de esto no es clara (Galantito – Homer H y col. y Parrish J y col. citados Sierra y Olivera, 2000). La capacitación inducida por la heparina no involucra la salida de colesterol de la membrana (Therien I et al citados por Sierra y Olivera, 2000).

La heparina induce capacitación y aumenta la concentración intracelular del calcio a través de la activación de un canal de voltaje L (Córdoba y col. citados por Rosatti, 2003). La heparina induce la capacitación del espermatozoide por varios mecanismos (First y Parrish, 1987):

- ✓ Desplaza las proteínas decapacitantes de la membrana espermática.
- ✓ Estimula la apertura de los canales para el ión calcio, comportándose como un ionóforo.
- ✓ Activa la acción del AMP-c y de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (que aumenta la concentración de fosfolípidos, como la fosfatidilcolina, que, en presencia de Ca<sup>2+</sup> induce la reacción acrosómica). La heparina actúa en este caso inmovilizando el ión Zn, que se comporta como inhibidor de la fosfolipas.
- ✓ Favorece la conversión de pro-acrosina en acrosina

#### **1.5.8.2. PHE (Penicilamina, Hipotaurina y Epinefrina)**

Las catecolaminas y los aminoácidos, como de penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE) es empleado en la fertilización *in vitro*, adicionándolo al medio, por sus efectos benéficos sobre los resultados obtenidos ya que actúa como antioxidante sobre el medio, estimula la capacitación espermática, aumenta la motilidad, penetración de ovocitos y reacción acrosómica (Andrews y Bavister, 1989).

La fertilización generalmente se realiza en microgotas de HEPES, a un pH de 7.8. También se utiliza PHE (penicilamina, hipotaurina y epinefrina) como estimulante de la motilidad espermática. Antes de la fertilización generalmente se retiran las células del cúmulus de los ovocitos maduros, y este proceso se puede realizar por pipeteo como en nuestro caso o con la adición de citrato de sodio al 3%, sin provocar ningún daño, para limpiar al ovocito (Gordon, 1990)

Diversos autores como por (Yanaginiachi 1988) indican la existenciade catecolaminas (epinefrina), varios aminoácidos (taurina, hipotaurina) y penicilamina, en el oviducto del hámster, cuyos niveles aumentan en los días del estro. Susko-Parrish y col, (1990) y Gordon (1990) señalan que la utilización de estos factores de motilidad presenta resultados satisfactorios, en el proceso de la FIV bovina.

#### ❖ **Mecanismo de acción *in vitro***

##### **a. Penicilamina**

La Penicilamina ha sido utilizada con éxito para capacitar espermatozoides (Andrews y Bavister, 1989). Su efecto sobre los espermatozoides puedes ser debido a que dicha sustancia es capaz de quelar cationes divalentes como el zinc, el cual parece inhibir la capacitación y mantener a los espermatozoides en un estado metabólico. Además, la Penicilamina, cuando es utilizada en presencia de epinefrina, parece incrementar el porcentaje de espermatozoides que sufren la reacción acrosómica (Meizel y Working, 1980).

##### **b. Hipotaurina**

La Hipotaurina, un  $\beta$ -aminoácido azufrado, permite mantener una motilidad espermática excelente (Le Guienne y col., 1988) e incluso incrementar la motilidad y la penetración de los ovocitos (Ball y col., 1984; Ahuja, 1985). Este compuesto protege a los lípidos de la peroxidación y promueve la agregación de los espermatozoides (Ahuja, 1985). La Hipotaurina ha sido utilizado con éxito para la capacitación de espermatozoides bovinos descongelados (Saeki y col., 1991) pero requiere periodos de incubación largos (7-8h), por lo que muchos laboratorios la introducen en el medio de fecundación en vez de incubar previamente a los espermatozoides con ella (Gordon y Lu, 1990; Schellander y col, 1990).

### **c. Epinefrina**

La epinefrina, una catecolamina que además de estimular la motilidad espermática, induce la reacción acrosómica y mejora la penetración de los ovocitos. Sin embargo, la exposición previa de los espermatozoides a la hipotaurina parece ser prerequisite para la acción de la epinefrina en la capacitación (Leibfried y Bavister, 1982) y se ha demostrado que la combinación de ambos compuestos produce un aumento tanto de la penetración como de la formación del pronúcleo masculino (Ball y col, 1984).

### **d. Dependencia mutua del PHE**

Aunque la suplementación del medio de fecundación con Penicilamina, Hipotaurina y Epinefrina (PHE) es una práctica habitual en muchos laboratorios, los estudios realizados para evaluar su acción sobre la fecundación no son abundantes. En el bovino, el primer trabajo sobre el efecto de la penicilaminay/o la hipotaurina y epinefrina en el medio de fecundación fue realizada con espermatozoides epidimarios por Ball y col, en 1983, quienes observaron que la adición tanto de hipotaurina y epinefrina como de PHE mejoraba resultados de fecundación. Posteriormente, Susko-Parrish y col, (1990) observaron que la presencia de PHE disminuía el tiempo transcurrido entre la inseminación y la penetración del ovocito, aunque, si la duración del co-cultivo de los gametos era suficientemente larga, no se observaban diferencias entre las tasas de penetración de ambos grupos.

Según Long y col. (1993, 1994) cuando los espermatozoides son capacitados con heparina, la adición de PHE no varía los resultados de fecundación normal, polispermia y desarrollo hasta blastocisto. Sin embargo, Miller y col. (1992, 1994) describen un aumento de la tasa de fecundación, división y primeros estadios de desarrollo cuando, al fecundar con espermatozoides incubados con heparina, está presente la mezcla de PHE sobre FIV es debido a su efecto antioxidante sobre el medio de fecundación, ya que ha sido demostrado que tanto la Hipotaurina como la epinefrina limitan la formación de radicales su peróxido y, por tanto, peroxidación lipídica de los gametos.

En un estudio realizado por Vergos (1990) en el bovino, la suplementación del medio del FIV con una mezcla de PHE dio mejores resultados de división y desarrollo que la cafeína y el control. Estos resultados no se corresponden con los hallados en el búfalo por Totey y col. (1992) sobre el uso de cafeína y heparina juntas o de PHE proporciono

resultados de penetración inferior. No obstante, esta diferencia disminuyó al comparar las tasas de división y desapareció en las de desarrollo hasta mórula y Blastocisto.

### **1.5.8.3. BSA**

En un estudio realizado en equinos por Thomas y col, 2006; utilizan el medio llamado BWW. Los espermatozoides fueron diluidos utilizando este medio más albúmina sérica y cafeína 1 mM, asegurando capacitación espermática. Visicato M, 2007; trabajando con espermatozoides de la cola del epidídimo en bovinos, utilizó un medio de lavado buffer fosfato dextrosa que contiene 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM glucosa, 16.3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, y 100 U/ml de penicilina. En este estudio también utilizaron 5 ml de BWW mencionado anteriormente y suplementado con heparina o albúmina sérica bovina (Thomas y col, 2006).

Cross NL, y col, citado por Sierra y Olivera, 2000; nos comprueba que la albúmina sérica presente en los medios de capacitación (ratón, humanos, ganado y bovinos) parece actuar de manera similar al plasma seminal como un “excavador” que permite remover el colesterol (CHOL), lo cual puede llevar a cambios en la fluidez de la membrana plasmática (Wolf y col. citados por Sierra y Olivera, 2000). Algunos experimentos han demostrado que existen otras proteínas que se unen al CHOL, tales como las HDL o proteínas que transfieren los lípidos presentes en el fluido folicular u oviductal, las cuales pueden reemplazar a la albúmina en los ensayos In Vitro (Therien, y col, citados por Sierra y Olivera). El colesterol presente en el eyaculado humano puede ser necesario para evitar que los componentes del plasma seminal remuevan el colesterol de la membrana en forma temprana (Sierra y Olivera, 2000).

### **1.5.8.4. Cafeína**

Kim y col, 2002, utiliza el mismo medio en bovinos suplementado con 10 mM de benzoato sódico de cafeína. La suspensión final de espermatozoides fue mezclada con 50 µl de medio que contiene 20 µg/ml de heparina y 20 mg/ml de albúmina sérica bovina, para fertilizar de 5-15 oocitos. Los resultados arrojados demostraron que la capacitación culmina aproximadamente en 260 minutos y la penetración de la zona pelúcida en 50 minutos, utilizando este medio.

#### **1.5.8.5. Otros efectores de los mensajeros intracelulares en la capacitación espermática *in vitro***

##### **a. Calcio**

El calcio ingresa al espermatozoide como consecuencia de la apertura de los canales dependientes del voltaje, por despolarización de la membrana plasmática. El calcio juega un papel muy importante en la transducción de señales, actuando como enzima efectora a través de la adenilato ciclasa (AC), enzima que regula el metabolismo del AMPc (Visconti y col. citados por Sierra y Olivera, 2000).

##### **b. Bicarbonato**

Su requerimiento ha sido demostrado en algunas especies; el movimiento transmembranal de este anión, probablemente a través de antiportes  $\text{NA}^+/\text{H}^+$  podría ser el responsable del aumento del pH intracelular observado durante la capacitación (Cross y col. y Hunter Ag y col. citados Sierra y Olivera, 2000). Adicionalmente podría regular el metabolismo del AMPc, ya que en los espermatozoides la AC es estimulada directamente por este anión (Visconti y col, Okamura y col. y Garty y col. citados por Sierra y Olivera, 2000). Los cambios en la concentración de bicarbonato, bajas en el epidídimo y altas en el plasma seminal y en el oviducto, podrían jugar un papel importante suprimiendo la capacitación en el epidídimo y promoviéndola en el tracto femenino (Brooks DE citado Sierra y Olivera, 2000).

##### **c. Radicales libres**

La acción de los radicales libres en la función espermática parece estar relacionada con la hiperactivación de la movilidad y la capacitación. Algunos investigadores encontraron que las especies reactivas de oxígeno regulan la fosforilación de varias proteínas después de la estimulación de NAPH-oxidasa endógena o la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Aitken y col. y Leclerc y col. citados por Sierra y Olivera, 2000); esto mejora la capacitación y el adosamiento a la zona pelúcida.

#### **1.5.8.6. Reacción acrosómica *in vitro* y la motilidad del látigo**

Lamirande, 1997, asegura que las modificaciones en la membrana plasmática del esperma ocurren durante la capacitación y reacción acrosómica al exponer reacciones de las proteínas del oocito en la superficie del esperma. Estas modificaciones incluyen desenmascaramientos y movimientos de sitios a la localización correcta en la cabeza espermática como preparación para la fusión con la membrana plasmática del oocito.

Yanagimachi, y col citados por Pérez y Pérez, 1985, han demostrado que la adquisición de la motilidad llamada de látigo (wiplash motility) es, conjuntamente con la reacción acrosómica, condición imprescindible para que se pueda realizar la fecundación. Para que se establezca este tipo especial de motilidad, caracterizado por un enorme aumento de la frecuencia y amplitud de los movimientos del flagelo (cola), es esencial la presencia de iones calcio en el medio de cultivo.

### **1.5.9. Cultivo *in vitro* de cigotos**

La eficiencia de un sistema de cultivo *in vitro* de embriones bovinos, puede ser expresada en los siguientes términos: porcentaje de ovocitos que alcanzan el estadio de 2 células (clivados); porcentaje de cigotos que superan el estadio de 8-16 células (bloqueo); porcentaje de compactación en el estadio de mórula; porcentaje de embriones que evidencian formación del blastocele; y eclosión en el estadio de blastocisto (Xu y col., 1992).

Es de conocimiento que el desarrollo embrionario modifica su metabolismo especialmente a partir del estadio de mórula para adelante cuando la función oxidativa adquiere una mayor importancia. La fosforilación oxidativa empleando el piruvato y aminoácidos es la principal fuente de energía durante los 3 primeros días de desarrollo, siendo posteriormente cambiada por el glucólisis desde el 4 día en adelante hasta el estadio de blastocisto (Palma, 2008).

La suplementación de los medios con aminoácidos, permiten aumentar el desarrollo embrionario durante la división, regular el incremento o disminución del volumen celular, y favorecer el desarrollo embrionario con miras a su implantación (Palma, 2008). El suero al ser una mezcla compleja de biomoléculas es más beneficioso durante el desarrollo embrionario desde el estadio de mórula en adelante (Palma, 2008).

#### **1.5.9.1. Condiciones y sistema de cultivo *in vitro* de embriones**

Aunque la maduración y la fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos, puede llevarse a cabo en una gran variedad de condiciones de cultivo; hay grandes diferencias en la calidad de los mismos, especialmente en el número de células y viabilidad en general. Por lo tanto, para desarrollar un sistema de cultivo de embriones que produzca resultados aceptables, se deben tomar en cuenta dos enfoques: La determinación de las

necesidades bioquímicas del embrión y su desarrollo; La consideración del medio ambiente en el cual los embriones se encuentran *in vivo*, ambos de igual importancia, por lo que es necesario considerarlos juntos (Thompson, 1996).

En cuanto a la atmósfera gaseosa las más empleadas son las que contiene 5% de CO<sub>2</sub> en el aire o la compuesta por 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 90% de N<sub>2</sub> (Herradon y col., 2007). Los sistemas de cultivo pueden ser continuos con el mismo medio de cultivo durante los 7 días de CIV o puede haber un cambio de medio (de KSOMaa a SOFaa) al 3 día, ya que se ha demostrado que el uso de medio SOFaa permite la obtención de embriones de mejor calidad (Herradon y col., 2007; Pahuara y col., 2014). El cultivo embrionario puede darse en gotas o en pocillo, tomando en cuenta la relación medio – número de embriones que se debe mantener para poder evitar la competencia por los sustratos, y favorecer el sinergismo en el desarrollo embrionario (Palma, 2008).

#### **1.5.9.2. Desarrollo embrionario *in vitro***

En diferentes evaluaciones realizadas a embriones producidos *in vivo* e *in vitro*, se encontraron significativas diferencias en la morfología, permeabilidad de la membrana, densidad, número de células y características de la zona pelúcida. Por otro lado, se determinó que los embriones PIV tienen una menor viabilidad, así como presentaron alteraciones morfológicas, bioquímicas y metabólicas. También presentaron una mayor susceptibilidad al enfriamiento y criopreservación (Palma, 2008; Bravo y col., 1996). Sin embargo, una característica importante es que los embriones PIV alcanzan el estadio de desarrollo con una anterioridad de 1 día respecto a los embriones *in vivo*, siendo indicados la temperatura y el suero como los factores inductores del desarrollo acelerado (Palma, 2008). De todas maneras, existen escasas referencias en cuanto a la PIV de embriones en camélidos y el desarrollo embrionario de estos ha permanecido bajo en comparación con otras especies (Trasorras, 2012).

#### **1.5.9.3. Clasificación y evaluación de embriones**

La evaluación embrionaria se puede dar en dos aspectos: uno cuantitativo y otro cualitativo. En el aspecto cuantitativo, se toma el número de embriones que desarrollan en los diferentes momentos del cultivo, sobre el número de cigotos cultivados para la maduración o divididos el día 1 después de la fecundación, expresado en porcentaje (Palma, 2008).

$$\% \text{ de embriones} = \frac{N^{\circ} \text{ de embriones divididos}}{N^{\circ} \text{ de cigotos cultivados}} \times 100$$



## **CAPÍTULO II**

### **METODOLOGÍA**

#### **2.1. LUGAR DEL EXPERIMENTO**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la estación experimental de CANAAN (INIA), que está ubicado en el distrito de Andrés Avelino Cáceres Dorregaray, de la provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, a una latitud Sur: 13°09'48", longitud Oeste: 74°12'20", altitud: 2,750 m.s.n.m, temperatura: 12–18 °C, precipitación: 250 – 500 mm (<http://www.inia.gob.pe/>).

#### **2.2. MATERIALES Y EQUIPOS**

##### **2.2.1. Materiales de laboratorio**

- Placas Petri pequeña, mediana y grande
- Laminas portaobjeto
- Laminas cubreobjetos
- Vaso de precipitación
- Probeta
- Pipeta de Pasteur de vidrio
- Caja de guantes estériles
- Gradillas
- Tubos falcons de 10, 15, 20 y 50 ml
- Filtros de 0,22  $\mu$
- Placas well de 4 pocillos
- ½ Cajas de jeringas descartable de 1, 3, 5, 10, 20, 50ml (de cada uno)
- Cajas de guja de 18G, 20G, 21G, 22G.

##### **2.2.2. Materiales de campo**

- Caja guantes estéril
- Termo para colección ovarios

- Estuche de disección

### **2.2.3. Materiales biológicos**

- Ovarios obtenidos en el matadero de Pilpichaca.
- Epidídimos obtenidos en el matadero de Pilpichaca.

### **2.2.4. Equipos**

- Microscopio
- Estetoscopio
- Vortex
- Platina
- Estufa de incubación
- Autoclave
- Equipo de flujo laminar
- Balanza digital
- Refrigeradora
- Baño maría
- pH metro

### **2.2.5. Medios para la fertilización in vitro.**

- **Medio de lavado o de manipulación:**

Medio TALP HEPES

- **Medio de maduración:**

Medio TCM-199

- **Medio de fertilización:**

Medio FIV TALP

Medio SPERM TALP

- **Medio de cultivo:**

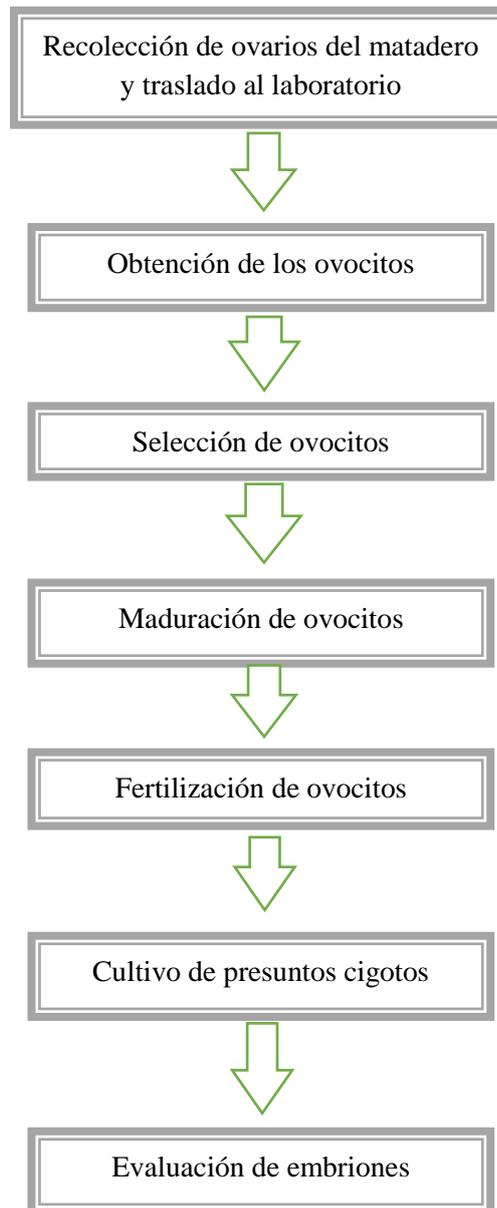
Medio SOF

- PBS ( fosfato buffer salina )
- BSA (suero albumina bovina).
- Agua ultra Pura

### 2.3. PROBLEMA ESPECÍFICO

Cómo influye el uso de PHE (Penicilamina, Hipotaurina, Epinefrina) y Heparina en la fertilización de ovocitos para la calidad y cantidad de embriones producidos *in vitro* en alpacas (*Vicugna pacos*)

### 2.4. PROCEDIMIENTO DE LA FERTILIZACIÓN *IN VITRO*



Fuente: propio

#### 2.4.1. Preparación de medios

La preparación de los medios Stocks (**anexo 1**) se realizó una semana antes de la fase experimental. Mientras la preparación de medios para el cultivo para cada etapa de producción de embriones se prepara un día antes (**anexo 2**).

#### **2.4.2. Obtención de ovarios y testículos**

La recuperación de ovarios se realizó en el matadero de Pilpichaca, donde se aprovechó la cantidad de hembras faenadas del día para cada repetición. La unidad de muestra se recolectó con una tijera y pinza estéril, los cuales fueron almacenados en un termo que contenía SSF al 0.9% más la gentamicina (80mg/ml) temperado a 37°C. Los testículos se extrajeron cuidadosamente sin dañar el epidídimo con la ayuda de una tijera y luego puestos en papel toalla envuelto a temperatura del ambiente.

Luego los ovarios y los testículos fueron transportados por 3 horas al laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental CANAAN. Una vez en el laboratorio los ovarios fueron lavados 3 veces como mínimo con la solución de transporte (SSF al 0.9% con gentamicina) para eliminar la sangre y tejido, que fueron depositados en un vaso precipitado con 500ml de SSF y antibiótico, éste a una temperatura de 37°C hasta la recuperación de ovocitos.

#### **2.4.3. Recuperación y selección de ovocitos**

La recuperación de los ovocitos se realizó por el método de Slicing (Martino y col., 1995), que consiste en:

- Realizar cortes a nivel de la superficie de los folículos de 3 a 8mm con una hoja de bisturí y una pinza simple en una plac-petri de vidrio que contenía el medio de manipulación (SSF) suplementado con SFB con gentamicina (**anexo 02**) y manejado en una platina térmica de 38°C.

La selección de ovocitos se realizó con la ayuda de un estereoscopio incorporado con una platina atemperada 38°C y con una micropipeta de 20µl en el medio de manipulación. Se consideraron ovocitos viables a todos aquellos que tenían 2-5 o más capas compactas de células del cumulus y con citoplasma homogéneo y descartando aquello que tiene citoplasma pictónico, degenerado y células con cúmulos menos de una capa (Ratto, 2005).

#### **2.4.4. Maduración *in vitro* de ovocitos**

Los ovocitos para ser puestas en maduración fueron seleccionados, y éstos lavados 2 a 3 veces en el medio de maduración (TCM -199), que fue suplementado con:

- Piruvato de sodio en una concentración 0.011g/ml,
- FSH 0,05µg/ml,
- LH 0.5µg/ml,
- Glutamina a una concentración de 100mM,
- IGF 10ng/ml,
- Estradiol 17-β 1µg/ml,
- SFB al 10%
- Sulfato de gentamicina 80 mg/ml.

Una vez lavado los ovocitos se cultivaron en medio de maduración (TCM-199) en 4 multipocillos wells de 500ul c/u y puestas a una incubadora por 36 horas en condiciones de 39°C, 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad de 90%.

#### **2.4.5. Fertilización *in vitro* de ovocitos**

##### **2.4.5.1. Recuperación y selección de espermatozoides**

Primero se preparó Andromed (dilutor comercial del laboratorio sigma) con agua milliquiu 1:4 atemperado en una estufa de 37°C y depositado en pequeñas placas petri. La recuperación de espermatozoides se hizo de la cola del epidídimo, donde la técnica consistió en:

- Limpiar la membrana vaginal y visceral del testículo.
- Luego con la hoja de bisturí se realizó cortes transversales y verticales en el epidídimo cuidadosamente sin cortar arteriolas y así evitar que se mezcle con la sangre, ya que las toxinas liberadas de las células sanguíneas llegan a alterar la supervivencia y la motilidad de los espermios recuperados.
- Después, el borde dónde se realizó los cortes al epidídimo se rosó cuidadosamente al dilutor que han sido depositado en placas Petri.
- Luego los espermios recuperados fueron llevados al microscopio para evaluarlo la motilidad y la concentración, y se dejó 15 minutos a temperatura ambiente para refrigerarlo y posteriormente congelarlo.

##### **2.4.5.2. Selección de espermatozoides por la técnica *percoll*.**

Los espermatozoides se seleccionaron por el método *percoll*, donde la centrifugación en gradiente de éste se realiza con mayor rapidez y permite recuperar un mayor número de espermatozoides (Avery y Greve, 1995).

En un vial de 1ml se le depositó cuidadosamente por la pared 3 insumos:

- 200µl *percoll* al 90%,
- Seguido de 200µl de *percoll* al 45%,
- Luego agregarle 200µl de espermatozoides, evitando en todo momento que se mezclen y al final se observó meniscos de división entre los componentes.
- Se llevó a centrifugar a 2000rpm por 20 minutos, luego se eliminó el sobrenadante.
- Inmediatamente se adicionó 1 ml de medio de capacitación TALP-SPERM y se volvió a centrifugar a 1000rpm por 10 minutos, después se eliminó el sobrenadante y quedando así solo el pellet.
- Para inseminar los ovocitos se le agregó 100µl de medio de fertilización TALP-FIV atemperado en una estufa a 37°C.

#### **2.4.5.3. Fecundación *in vitro***

La fertilización se realizó a cabo después de 36 horas posterior al inicio de la maduración. Se preparó el medio de fertilización (TALP-FIV) suplementado con piruvato 0.011g/ml, BSA 3mg/ml y gentamicina 80 mg/ml y acondicionado en la incubadora media hora antes del lavado y fertilización, para que:

- Luego los ovocitos que sufrieron la expansión de sus cúmulos fueron seleccionados y lavados 2 a 3 veces
- Posteriormente cultivados en el medio de fertilización de 500µl en cada uno de los 4 multipocillos wells que se le asignó para cada uno de los 4 tratamientos.
- Después, a los pocillos se agregaron 2µl de semen capacitados por gradiente de *percoll* a los 4 tratamientos.
- 5µl de heparina al 2% y 21µl de la solución de PHE (2mM de Penicilamina, 1mM de Hipotaurina y 250mM de epinefrina), según la siguiente distribución: T1= control; T2=Heparina; T3=PHE; T4= Heparina + PHE.

El cultivo se realizó por 18 horas en una incubadora en condiciones de 39°C, 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad de 90%.

#### **2.4.6. Cultivo *in vitro* de cigotos**

Terminado el tiempo de Co-cultivo de gametos se pipeteó los presuntos cigotos en los mismos pocillos wells de cada tratamiento y posteriormente se procedió a lavar 3 veces en el medio de cultivo SOF (**anexo 2**) y fueron cultivadas en nuevas placas de

multipocillos wells en 500µl del medio de cultivo por 7 días, al tercer día se cambió de medio. El cultivo se realizó en una incubadora en condiciones de 39°C, 5% de CO2 y una humedad de 90%.

#### 2.4.7. Clasificación de embriones

Terminado los días de cultivo a los 7 días, se procedió a evaluar el desarrollo embrionario de acuerdo su cantidad y calidad, según la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria IETS, los embriones se clasificaron de excelente (1) a malo (4).

**Tabla 2.1.** Escala de clasificación de calidad embrionaria, según IETS

Después de 7 días de cultivar		Características
<b>I</b>	Excelente.	Masa embrionaria esférica y simétrica, con células (blastómeros) uniformes en cuanto a tamaño, color y densidad. La zona pelúcida deberá presentar superficies lisa.
<b>II</b>	Bueno.	Irregularidades moderadas en cuanto al aspecto, forma, tamaño, color y densidad de las células. con una masa embrionaria viable
<b>III</b>	Regular.	Irregularidades mayores en la forma y tamaño de la masa embrionaria, así como en el tamaño, color y densidad de células individuales.
<b>IV</b>	Malo.	Embrión, ovocito e embriones de 1 célula degenerados, no viables.

Fuente: (De la Fuente J) INTA, 2010

#### 2.5. DISEÑO ESTADÍSTICO

Para evaluar el efecto de los agentes capacitantes agregado al medio de fertilización sobre la tasa de fecundación, clivaje y desarrollo embrionario, las variables respuesta de las 10 repeticiones fueron sometidas a un diseño completamente al azar. Se utilizó la prueba de comparación de Duncan, para el análisis de medias del efecto de los agentes capacitantes.

Los datos fueron sometidos a análisis de varianza ANOVA para los variables de interés en producción de embriones. A demás se utilizó estadígrafos de tendencia central (promedio) y de dispersión.

El diseño aditivo lineal para el diseño completamente al azar (DCA) se muestra a continuación:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Dónde:

**$Y_{ij}$** = es el j-ésimo elemento perteneciente al i-ésimo tratamiento.

**$\mu$**  = es la media general.

**$T_i$**  = efecto debido al i-ésimo tratamiento.

**$E_{ij}$** = error experimental asociado al j-ésimo elemento del i-ésimo tratamiento.

Los datos se procesaron con el programa estadístico SAS (sistema de análisis estadístico) versión 9.2.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE OVOCITOS VIABLES

Los ovocitos recuperados fueron un total de 1397 de los cuales, colectados de animales mayores de 2 años y de diferentes estados fisiológicos; estos ovocitos fueron recuperados por el método de Slicing con diámetro folicular de 3-7mm de y seleccionados solamente los de la categoría I, II y III.

**Tabla 3.1** Porcentaje de recuperación de ovocitos viables por método Slicing

<b>CALIDAD</b>	<b>CANTIDAD</b>	<b>%</b>
<b>Viables</b>	1132	81.03
<b>No viables</b>	265	18.97
<b>TOTAL</b>	1397	100

En la tabla 3.1, se observa el porcentaje de la recuperación de ovocitos viables, donde se obtuvo 81.03% y los no viables 18.97%.

Así mismo en alpacas Vasquez y col. (2015) obtuvieron 61.00% de ovocitos viables y Gomez y col. (2013) reportaron 67.90% de ovocitos viables; estos resultados son inferiores a los encontrados en el presente trabajo de investigación, esto se debería posiblemente al tiempo de transporte, donde Vasquez y col. (2015) transportaron los ovarios por 5-6 horas del lugar de colección hacia el laboratorio a comparación de 2.5-3 horas de transporte del presente trabajo de investigación; se conoce que el tiempo de transporte influye directamente en la viabilidad de ovocitos, Holt y Pickard (1999) reportaron que a largos periodos de transporte a 35-38 °C ocurre la autólisis celular en ovarios o cuando se hace a temperaturas de refrigeración. También se debe a que en el presente estudio consideraron como viables a los ovocitos hasta la calidad III, mientras que los autores citados solo consideraron como ovocitos viables los de la calidad I y II.

Así también, existen reportes encontrados en otras especies, Hernández y col. (2010) en bovinos con 63.85%, y Wani y col. (2000) en ovinos con 54.3% de ovocitos viables usando el método de recuperación por corte (Slicing), estos resultados son inferiores a los resultados del presente estudio, se debería posiblemente a la diferencia entre especies y los criterios que consideraron los autores para clasificar como ovocitos viables.

**Tabla 3.2.** Promedio de ovocitos viables por ovario, recuperados por método Slicing en alpacas (*Vicugna pacos*), Ayacucho 2017.

Promedio $\pm$ DE	Coefficiente de variabilidad (%)	Mínimo	Máximo
5.00 $\pm$ 0.42	8.43	4.38	5.64

En la tabla 3.2, se muestra el promedio de ovocitos viables por ovario recuperados por el método Slicing, obteniéndose 5.00 $\pm$ 0.42 ovocito viables/ovario, con un coeficiente de variabilidad de 8.43%. Gómez y col (2013) utilizando el método Slicing obtuvieron 2.56 $\pm$ 0.89 ovocitos viables/ovario, este resultado es inferior al presente trabajo de investigación, esta diferencia se debería posiblemente a la edad, el estado fisiológico y nutricional de las alpacas, ya que se ha demostrado la influencia nutricional en la actividad ovárica en el caso de los vacunos (Ruiz y col., 2008); del mismo modo en el presente trabajo de investigación se consideraron como ovocitos viables hasta la categoría III, mientras que Gómez y col (2013) solo consideraron las categorías I y II. También podría haber influido la habilidad y la técnica utilizada por el personal del laboratorio.

Así también, se encontró reportes por Hernandez y col. (2010) en vacunos con 4.37 $\pm$ 1.45 de ovocitos viables/ovarios similares al presente trabajo de investigación.

### 3.2. PROMEDIO (%) DE PRODUCCIÓN DE EMBRIONES

Los embriones producidos por fertilización *in vitro* fueron obtenidos utilizando una atmósfera de 5%CO<sub>2</sub> y 5%O<sub>2</sub> a una humedad de 90%, obteniéndose los siguientes resultados.

**Tabla 3.3.** Promedio de clivaje a las 24h pos-cultivo suplementados con PHE y Heparina en el medio de fertilización con cigotos de alpaca (*Vicugna pacos*).

<b>Tratamiento</b>	<b>Cigotos cultivados</b>	<b>Promedio ± DS %</b>	<b>CV (%)</b>
<b>(T1) Control</b>	184	16.53±1.33 <sup>a</sup>	44.44
<b>(T2) Heparina</b>	202	19.92±0.94 <sup>a</sup>	23.57
<b>(T3) PHE</b>	207	21.42±1.49 <sup>ab</sup>	34.75
<b>(T4) PHE + Heparina</b>	243	23.90±2.71 <sup>b</sup>	47.57

<sup>a,b</sup>letras diferentes en la misma columna indica que hay diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ )

En la tabla 3.3, se observa el promedio de clivaje a los 24 horas pos-cultivo, obteniéndose 16.53±1.33, 19.92±0.94, 21.42±1.94 y 23.90±2.71% para los tratamientos T1:Control, T2:Heparina, T3:PHE y T4:PHE+Heparina respectivamente, mostrando diferencia estadística entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ), obteniendo mayor porcentaje de clivaje con el (T4)PHE+Heparina seguido del (T3)PHE.

Al respecto del clivaje (división celular) a los 24h pos-inseminación no se encontró reportes ni publicaciones en alpacas con ninguno de los tratamientos. Sin embargo, se encontraron reportes y publicaciones sobre la tasa de división celular a los 48 y 72 horas pos-inseminación. Huanca y col., (2014) en alpacas utilizando el (T4)PHE+Heparina obtuvieron 15.6±9.24% de división celular a 72h para ovocitos madurados por 36 horas, ésta inferioridad al presente trabajo de investigación se debería posiblemente a que el autor transporto los ovarios al laboratorio dentro de 8 a 10 horas siguientes, y en donde también la recuperación de ovocitos fue por el método de aspiración folicular. Terreros y col., (2015) reportaron a las 72h pos-fecundación 46.6 y 26.6% de división celular con espermatozoides descongelados de los grupos congelados con dimetilsulfóxido y glicerol respectivamente, esta superioridad del primero a la investigación se debería posiblemente al tiempo de evaluación pos-fecundación y al crioprotector utilizado en la congelación de los espermios, ya que dicho autor menciona a que la mayor supervivencia espermática con el uso de dimetilsulfóxido se debería a la rápida penetración en las células espermática por su menor peso molecular (78.13 g/mol) en comparación al glicerol (92.09 g/mol), lo que favorecería su acción protectora, ya que en el presente trabajo de investigación se evaluó a los 24h pos-fecundación y se utilizó un producto comercial (andromed) como dilutor y crioprotector para la congelación.

Así mismo, se encontraron reportes sobre la división celular en otras especies. Pahuara y col., (2014) en bovinos obtuvieron 39,19% de división celular a las 48h utilizando Heparina. El-Shahat y col. (2017) en carneros obtuvieron 50.00% de división celular, Ahuja y col (2009) en bovinos con 82.3% de división celular a las 48 horas y Miller y col. (1992) obtuvieron 55% de división celular a 45 horas utilizando PHE. Quintanilla y col. (2015) usando PHE + Heparina en el medio de fertilización obtuvieron 43.6% de división celular (72h). La superioridad a cada uno de los tratamientos de este trabajo de investigación se debería posiblemente a la diferencia entre especies y al tiempo de evaluación realizado del clivaje, ya que los autores mencionados anteriormente evaluaron la división celular mayores a 24 horas.

**Tabla 3.4.** Promedio de producción de mórulas con la suplementación de Heparina y PHE en el medio de fertilización con cigotos de alpacas (*Vicugna pacos*).

<b>Tratamiento</b>	<b>Cigotos cultivados</b>	<b>Promedio ± DS (%)</b>
<b>(T1) Control</b>	184	24.73±1.71 <sup>a</sup>
<b>(T2) Heparina</b>	202	29.49±1.69 <sup>ab</sup>
<b>(T3) PHE</b>	207	35.00±2.96 <sup>cb</sup>
<b>(T4) PHE + Heparina</b>	243	35.30±2.64 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup>letras diferentes en la misma columna indica que hay diferencia estadística significativa (p≤0.05)

En la tabla 3.4, se muestra el promedio de producción de mórulas en alpacas, donde se obtuvieron 24.73±1.71%, 29.41±1.69%, 35.00±2.96% y 35.30±2.64% para los tratamientos (T1) Control, (T2) Heparina, (T3) PHE y (T4) PHE+Heparina respectivamente, donde existe diferencia estadística significativa entre tratamientos (p≤0.05) obteniendo mayor porcentaje de mórulas con el (T4) PHE+Heparina seguido por el (T3) PHE.

Cabe mencionar que no se encontró reportes ni publicaciones con respecto al porcentaje de mórulas en alpacas suplementados con (T3) PHE al medio de fertilización. Sin embargo, Contreras y col., (2014) en alpacas, con el uso de (T2) Heparina reportaron 15.80% de mórulas con espermatozoides seleccionado por *percoll*, este resultado es inferior a los encontrados en el presente estudio, esto se debería posiblemente a que el autor utilizó el método de aspiración folicular en la recuperación de ovocitos, donde Brogliatti y col., (2000 ) sugieren que los ovocitos de alpaca serían más sensibles a la

aspiración folicular, ya que este método provocaría daños a nivel de los cúmulos del COC's y en algunas repeticiones no utilizó la mezcla de gases en el cultivo *in vitro* en algunos de sus repeticiones. El estudio realizado con uso de PHE+Heparina (T4) fue superior a los encontrados por Pérez y col. (2017) de 16.5% de mórulas, esta diferencia se debería posiblemente a que dicho autor utilizó el método de aspiración folicular en la recuperación de ovocitos y el método Swim-up en la selección de espermatozoides a comparación del presente trabajo de investigación que se utilizó el método de slicing y el *percoll*.

Asimismo, se encontraron reportes sobre el porcentaje de mórulas en otras especies, Pahuara y col., (2014) con el uso de (T2) Heparina obtuvieron 1,97% mórulas compactas, esta inferioridad se debería posiblemente a la diferencia entre especies, o a que el autor no tomo en cuenta a las mórulas tempranas a comparación del presente trabajo de investigación que si fueron consideraron. Goncalves y col. (2013) utilizando el (T4) PHE+Heparina reportaron 39.95% de mórulas, que es similar al resultado del presente trabajo de investigación.

**Tabla 3.5.** Promedio producción de blastocistos con la suplementación de Heparina y PHE en el medio de fertilización con cigotos de alpacas (*Vicugna pacos*) 2017

Tratamiento	Cigotos cultivados	Promedio ± DS (%)
(T1) Control	184	3.60±0.67 <sup>a</sup>
(T2) Heparina	202	3.25±0.82 <sup>a</sup>
(T3) PHE	207	4.52±0.99 <sup>a</sup>
(T4) PHE + Heparina	243	6.34±0.85 <sup>a</sup>

Sin diferencia estadística entre tratamientos ( $p \geq 0.05$ )

En la tabla 3.5, se muestra el promedio de blastocistos, donde se obtuvieron 3.60±0.67%, 3.25±0.82%, 4.52±0.99% y 6.34±0.85% para los tratamientos (T1) Control, (T2) Heparina, (T3) PHE y (T4) PHE+Heparina respectivamente, no habiendo diferencia estadística entre los tratamientos ( $p \geq 0.05$ ).

Respecto al porcentaje de blastocistos obtenidos no se encontraron reportes ni publicaciones en alpacas con la suplementación del (T3) PHE. Sin embargo, Contreras y col., (2014) reportaron 8.4% de blastocistos utilizando (T2) Heparina, esta superioridad se deba posiblemente al cambio de medio SOF a la hora al tercer día y

asimismo Pérez y col., (2017) utilizando (T4) PHE+Heparina reportaron 6.4% de blastocistos, los cuales son similares a los reportes del presente estudio.

Asimismo, se encontraron reportes sobre el porcentaje de producción de blastocistos en otras especies. En bovinos, García y col (2013) obtuvieron 53.6%, Ahuja y col. (2009) obtuvieron 31.6% y Kim y col. (2013) reportaron 54.1% de blastocistos utilizando (T3)PHE, estos resultados son superiores al presente trabajo de investigación, esta diferencia posiblemente se atribuye a la diferencia entre especies y razas, o a la concentración de los espermatozoides añadidos al medio de fecundación y el medio de cultivo utilizado por Ahuja y col. (2009), donde Kang y col. (2015) reportaron que a una concentración de espermatozoides de  $2 \times 10^6$  células/ml, se obtuvieron una fertilización normal estable y tasas de desarrollo de blastocitos y mientras a una concentración de espermatozoides de  $5 \times 10^6$  células /ml observó las tasas más altas de polispermia. También se debería a que Kim y col., (2013) utilizaron para la fecundación, espermatozoides que fueron incubados por 1h en medio de capacitación que contenía heparina.

**Tabla 3.6.** Promedio de producción de embriones con la suplementación de Heparina y PHE en el medio de fertilización con cigotos de alpacas (*Vicugna pacos*)

Tratamiento	Cigotos cultivados	Promedio $\pm$ DS (%)	CV (%)
(T1) Control	184	28.34 $\pm$ 1.66 <sup>a</sup>	32.61
(T2) Heparina	202	32.74 $\pm$ 2.01 <sup>ab</sup>	30.98
(T3) PHE	207	39.51 $\pm$ 2.98 <sup>cb</sup>	37.27
(T4) PHE + Heparina	243	41.64 $\pm$ 3.14 <sup>c</sup>	31.75

<sup>a,b,c</sup>letras diferentes en la misma columna indica que hay diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ )

En la tabla 3.6, se observa el porcentaje de producción de embriones en alpacas, obteniéndose 28.34 $\pm$ 1.66%, 32.74 $\pm$ 2.01%, 39.51 $\pm$ 2.98% y 41.64 $\pm$ 3.14% para los tratamientos (T1) Control, (T2) Heparina, (T3) PHE y (T4) PHE+Heparina respectivamente. Existiendo diferencia estadística entre el T1 y T2 con respecto al T3 y T4 ( $p \leq 0.05$ ) obteniéndose mayor porcentaje de embriones con (T4) PHE+Heparina y (T3) PHE. Cabe mencionar que no se encontró reportes sobre el porcentaje de embriones *in vitro* en alpacas suplementados al medio de fertilización con (T2) Heparina, (T3) PHE y (T4) PHE+Heparina.

Asimismo, se encontraron reportes sobre el porcentaje de embriones en otras especies. Pahuara y col., (2014) en bovinos reportaron 19,63 % utilizando el (T2) Heparina, este resultado es inferior al presente trabajo de investigación, esta inferioridad se atribuya posiblemente a la diferencia entre especies y a que dicho autor uso diferentes insumos en la preparación de algunos medios. Miller y col., (1994) en bovinos reportaron 25% de embriones utilizando el (T3) PHE, este resultado es inferior al presente trabajo de investigación, éste se atribuye posiblemente al método de selección de espermatozoides utilizado en este estudio e insumos añadidos en los diferentes medios de cultivo. Con el uso del (T4)PHE+Heparina por Urrego y col., (2008) en bovinos obtuvieron 18.8% de embriones, éste es inferior al presente trabajo de investigación, se debería posiblemente a la diferencia entre especies y el medio de cultivo usado, donde dicho autor utilizó el CR1aa como medio de cultivo, mientras que en el presente trabajo de investigación se utilizó el medio de cultivo SOF.

### 3.3. PROMEDIO (%) DE PRODUCCIÓN DE EMBRIONES SEGÚN CALIDAD

**Tabla 3.7.** Promedio de producción de embriones según calidad con la suplementación de Heparina y PHE en el medio de fertilización con cigotos de alpacas (*Vicugna pacos*)

Tratamiento	Cigotos cultivados	Promedio de embrión ± DS (%)			
		Calidad I	Calidad II	Calidad III	Calidad IV
(T1) Control	184	15.66±1.66 <sup>a</sup>	8.91±1.35 <sup>a</sup>	3.27±0.71 <sup>a</sup>	0.50±0.32 <sup>a</sup>
(T2) Heparina	202	19.19±2.26 <sup>ab</sup>	12.25±1.51 <sup>a</sup>	0.91±0.42 <sup>a</sup>	0.45±0.32 <sup>a</sup>
(T3) PHE	207	28.73±3.68 <sup>cb</sup>	8.94±1.48 <sup>a</sup>	0.33±0.32 <sup>a</sup>	1.51±0.67 <sup>a</sup>
(T4) PHE + Heparina	243	29.26±3.46 <sup>c</sup>	7.22±1.73 <sup>a</sup>	1.61±0.52 <sup>a</sup>	1.94±0.84 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> letras diferentes en la misma columna significa que hay diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ).

En la tabla 3.7 se observa la tasa de producción de embriones según su calidad, donde según calidad I en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 se obtuvieron 15.66±1.66, 19.19±2.26, 28.73±3.68 y 29.26±3.46% de embriones respectivamente, según calidad II en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 se obtuvieron 8.91±1.35, 12.25±1.51, 8.94±1.48 y 7.22±1.73% de embriones respectivamente, según calidad III en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 se obtuvieron 3.27±0.71, 0.91±0.42, 0.33±0.32 y 1.61±0.52% de embriones

respectivamente y según calidad IV en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 se obtuvieron  $0.50\pm 0.32$ ,  $0.45\pm 0.32$ ,  $1.51\pm 0.67$  y  $1.94\pm 0.84\%$  de embriones respectivamente, habiendo diferencia estadística en la calidad I entre tratamientos ( $p\leq 0.05$ ), obteniéndose mayor porcentaje de embriones de calidad I con el (T4) PHE+Heparina y (T3) PHE, con respecto a la calidad II, III y IV no se encontraron diferencia estadística entre tratamientos.

Cabe mencionar que no se encontró reportes ni alguna publicación sobre clasificación de embriones según la calidad producidos *in vitro* en alpacas agregándole al medio de fertilización con (T3) PHE y (T4) PHE+Heparina. El trabajo realizado en alpacas por Contreras y col. (2013) con el uso de Heparina de calidad I, II, III y IV reportaron 5.35, 9.53, 3.02 y 1.16% de embriones respectivamente, esta inferioridad se deba posiblemente a la falta del uso de mezcla de gases en el cultivo *in vitro* de embriones en algunas repeticiones debido a falta del balón con mezcla de gases.

Así mismo se encontró reportes en alpacas y vicuñas sobre la calidad de embriones producidos *in vivo*. Pacheco y col., (2016) quién evaluó la eficiencia de recuperación de embriones de ovulación simple, la calidad de los embriones y la fertilidad de la transferencia embrionaria interespecie, donde como donadoras fueron las alpaca, de las cuales se recuperaron 57.2%, 23.8% y 19.0% de embriones que fueron de grado 1°, 2° y 3° respectivamente, no habiendo embriones de grado 4; y Cárdenas y col., (2015) en un estudio realizado con el propósito de determinar la tasa de recuperación, calidad-morfológica y tamaño de los embriones colectados de vicuña, se recuperaron 55.56%, 44.44% y 11.11% de embriones de excelente, buena y regular calidad cuyo tamaño promedio fue de  $454.40\pm 92.13\mu\text{m}$ ,  $2200\pm 129.1\mu\text{m}$  y  $2800\mu\text{m}$  respectivamente, cabe mencionar que estos porcentajes se obtuvieron sin considerarse a los intransferibles.

## CONCLUSIONES

1. La Heparina, como agente capacitante influye en el mecanismo de unión de gametos en la producción *in vitro* de embriones, obteniéndose el 19.19% de embriones de excelente calidad.
2. El PHE, como agente capacitante influye en el mecanismo de unión de gametos en la producción *in vitro* de embriones, obteniéndose el 28.73% de embriones de excelente calidad.
3. Los agentes capacitantes PHE+Heparina juntos, influyen en el mecanismo de unión del ovocito con el espermatozoide en la producción *in vitro* de embriones, obteniéndose el 29.26% de embriones de excelente calidad.
4. Se obtuvo mejores resultados con los tratamientos T4 (PHE+Heparina) y T3 (PHE), concluyendo que los agentes capacitantes cumplen una función muy importante en la capacitación espermática y el mecanismo de unión del ovocito con el espermatozoide, e influye directamente en la fecundación y el clivaje del cigoto y consiguientemente contribuyendo en el porcentaje de producción *in vitro* de embriones de excelente calidad.

## RECOMENDACIONES

1. Seguir con estudios sobre la estandarización del protocolo de fertilización *in vitro* en Camélidos Sudamericanos.
2. Continuar con trabajos de investigación en la fertilización *in vitro*, utilizando componentes que interactúan en el mecanismo de fecundación vivo del ovocito con el espermatozoide, de igual forma los medios e insumo que forman parte del protocolo de fertilización *in vitro* en alpacas.
3. Para trabajos posteriores, utilizar diferentes concentraciones de glicosaminoglicanos, catecolaminas y aminoácidos en el medio de fertilización *in vitro*, porque influye directamente en la fecundación.
4. Se recomienda utilizar el PHE+Heparina una combinación de agentes capacitantes para la fecundación *in vitro*, mientras se estandarice el protocolo de fertilización *in vitro* en alpacas.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Adam E. y Hertiga A. 1964. Studies on Guinea Pig Oocytes. I. Electron Microscopic Observations on the Development of Cytoplasmic Organelles in Oocytes of Primordial and Primary Follicles. *The Journal of Cell Biology* 21 397-427.
- Ahuja K. 1985. Carbohydrate determinant involved in mammalian fertilization. *The American Journal of Anatomy* 174 207-223.
- Ahuja A., Montiel P., Pérez H. y Gallegos S. 2009. Alternative medium for in vitro production of bovine embryos. *Zootecnia Trop.*, 27(3): 1-8.
- Aitken R., Clarkson J. 1987. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fert* 81:459-469.
- Andrews J. y Bavister B. 1989. Hamster zona pellucida cannot induce physiological acrosome reactions in chemically capacitated hamster spermatozoa in the absence of albumin. *Biol. Reprod.*, 40: 117-122.
- Ángel D., Pérez N., Pareja A., Camargo O. y Urrego R. 2009. Efecto de la preparación espermática previo a la fertilización in vitro sobre la membrana plasmática y el ADN de semen bovino sexado. *Revista CES. Medicina Veterinaria y Zootecnia.* 4 (2): p1900-9607.
- Aurich C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2005; 89: 65-75.
- Avery B. y Greve T. 1995. Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology* 44, 871-878.
- Avilés, M., A. Gutiérrez-Adán, P. Coy (2010.). Oviductal secretions: Will they be key factors for the future ARTs. *Mol Hum Reprod.*, 16: 896-906.
- Ayuque A., Justiniano E., Mendoza J., Landeo L., Ruiz J. 2014. Efecto del tiempo de maduración in vitro en la capacidad meiótica y desarrollo de embriones de llama. *Spermova* 2014; 4(1): 99 – 101.
- Baldi, E., Luconi M., Bonaccorsi L., Forti G. 2002. Signal transduction pathways in human spermatozoa. *J. Reprod. Immunol.*, 53: 121-131.
- Ball, G., Leifried M., Lenz K., Ax R., Bavister B. y First N. 1983. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.* 28: 717-725.
- Ball, G., Leifried M., Ax R. y First N. 1984- Maturation aid fertilization of bovine oocyte in vitro. *J. Dairy Sci.* 67: 2715-2785.

- Bavister, B., Rose-Hellekant T. 1992. Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*, 37:127-146.
- Björndahl L, Mohammadiehl M, Pourian M, Söderlund I, Kvist U. 2005. Contamination by seminal plasma factors during sperm selection. *J Androl* 2005; 26: 170-3.
- Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA. 2002. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 66:38-43.
- Bowles J, Koopman P. 2010. Sex determination in mammalian germ cells: extrinsic versus intrinsic factors, *Reproduction* 139, 943–958.
- Brackett B. 1985. In vitro oocytes maturation and fertilization. *J. Anim. Sei* 61:14.
- Bravo W, Moscoso J, Ordoñez C, y col. 1996. Transport of spermatozoa and ova in female alpaca. *Anim. Reprod. Science.* 43: 173 – 179.
- Bravo W M, Sidkmore J A y Zhao X. 2000: Reproductive aspects and storage of semen camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 173-193.
- Brogliatti G., Palasz A., Rodriguez-Martinez, H., Mapletoft R. y Adams G. 2000. Transvaginal collection and ultrastructure of llama (*Lama glama*) oocytes. *Theriogenology* 54: 1269-1279.
- Cánovas, S. y Coy P. 2008. Molecular features of fertilization: gamete binding and fusion. *Rev. Invest. Clin.* 60:403-13.
- Cárdenas O, Sapaná R; Gonzales M, Mamani R, 2015. Algunas Características de los Embriones Colectados de Vicuña (*Vicugna vicugna*) en el CIP Quimsachata de INIA-PUNO. *Rev. Investing. Altoandín*; vol 17 N° 3:449-452.
- Chen M. y Bongs O. 1999. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. *Human Reproduction.* 14, 759-764.
- Chris D. y Anderson E. 2015. Llamas y Alpacas Atención Médica Cirugía, Reproducción. Lima: s.n.
- Clavón E. 2015. Evaluación de la criopreservación de ovocitos de alpacas (*Vicugna pacos*) en el laboratorio de la Biotecnología de la Reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria de la UTC. Latacunga-Ecuador. *Peg.* 23-30.
- Conde P., Herrera C., Trasorras V., Giuliano S., Director A., Miragaya M., Chaves M., Sarchi M., Stivale D., Quintans C., Agüero A., Rutter B., Pasqualini S.

2008. In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Anim. Reprod. Sci.* 109, 298–308.
- Contreras M, Olaguivel C, Naveros M, 2014. Evaluación de la calidad de embriones producidos por fertilización in vitro en alpacas (*Vicugna pacos*). XXXVII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Abancay 2014.
- Correa E., Ratto M., Gatica R. 1994. Universidad Austral de Chile Facultad de Ciencias Veterinarias, Archivos de medicina Veterinaria, Valdivia Chile 1994 pág. 59- 63.
- Dale B. y Elder K. 1997. In vitro fertilization. Cambridge University Press, p. 18.
- Del Campo M., Del Campo C., Donosos M., Berland M. y Mapletoft R. 1994. In vitro fertilization and development of *Lama glama* oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology* 41: 1219-1229.
- Dapino D., Marini P., Ocabada M. 2006. Effect of heparin on in vitro capacitation of boar sperm. *Biological Research*, 39(4):631-639.
- Dode M., Rodovhalo N., Ueno V., Fernandez C. 2002. The effect of sperm preparation and co-Incubation time on in vitro fertilization of *Bos indicus* oocytes. *Animal Reproduction Science*. 69: p15-23.
- Edwards R. 1965. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-351.
- El-Shahat K., Taysser M., Badr M. y Zaki K. 2017. Effects of penicillamine, hypotaurine, and epinephrine on motility, hyperactivity, acrosome reaction of fresh ram sperm. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 283-288.
- Fernández-Baca S. 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo de la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
- Fayrer-Hoskien, R. y Caudle P. 1991. Caudle Bovine in 'Airo fertilization: will the technique be practical. *Embryo transfer*. 5: 1-5.
- Filipiak, Y. y Larocca C. 2010. Fertilización in vitro en bovinos. Manual teórico practico. Area de Biotecnología de la Reproducción Animal. Facultad de Medicina veterinaria. Universidad de la republica Montevideo, República Oriental del Uruguay.

- First, N., Parrish, J. 1987. In Vitro fertilization of ruminants. J. Reprod. Fert; AI. Dublin. 34:151-165.
- Flint A. 1981. An unifying hypothesis for the control of blastocyst growth based on observations on the pig. J. Reprod. Fertil; 29:215-227.
- Frei, M. 2004. Desarrollo embrionario in vitro de ovocitos bovinos fecundados con espermatozoides adheridos al cumulus. Tesis de Grado. Universidad Católica de Temuco. Chile. 45p.
- Fry, R., Niall E., Simpson T., Squires T. y Reynolds J. 1997. The collection of oocytes from bovine ovaries. Theriogenology. Vol. 47, pp. 977-987.
- García R. y Martínez Q. 2013. Implementación de un protocolo de Fertilización in vitro en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano. Zamorano-Honduras, noviembre 2013.
- Gigli I, Russo A, Agüero A. 2006. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. In Vet. 2006, 8(1): 183-204.
- Gilbert. 2005. Biología del desarrollo. Editorial Médica Panamericana. 7° edición Buenos Aires, Argentina 670-673.
- Gómez, C., Ratto M., Berland M., Wolter M., y Adams G. 2002. Superstimulatory response and oocyte collection in alpacas. Theriogenology 57:584 (abstract).
- Gomez O., Choque D., Henao F., Escobedo M. y Valverde N. 2013. Comparison of three recovery methods of alpaca cumulus-oocyte complexes (COCs) harvested from postmortem ovaries in a slaughterhouse. Spermova ; 3(1): 103-104.
- Gonçalves F., Barretto L., Arruda R., Perri S. y Mingot G. 2013. Heparin and penicillamine–hypotaurine–epinephrine (PHE) solution during bovine in vitro fertilization procedures impair the quality of spermatozoa but improve normal oocyte fecundation and early embryonic development. In Vitro Cell.Dev.Biol. -Animal.
- González C. 2001. Reproducción bovina. Maracaibo- Venezuela. Editorial Astro Data.
- Gordon I. 1990. In vitro maturation (VM) and fertilization (IVF) of cattle ova. Embryo Transfer Newsletter, 8: 6-11.
- Gordon I. y Lu K. 1990. Production of Embryos in vitro and its impact on livestock production. Theriogenology, v. 33. pp. 77-87.

- Gordon I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, Oxon, UK: CAB International.
- Goto K., Konoshita A., Takuma Y. y Ogawa K. 1990. Fertilization by sperm injection incattle. *Theriogenology*. 33:238.
- Greve, T., y V. Madison. 1991. In vitro fertilization in cattle: a review. *Reprod. Nutr. Dev.*; 31(2): 147-157.
- Hafez B. 2000. Foliculogénesis, maduración del óvulo y ovulación. En: Hafez ESE, Hafez B (eds), Reproducción e inseminación artificial en animales. México: 1Me Graw-HillInteramericana, 70-83.
- Hallap T, Haard M, Jaakma U, Larsson L, Rodriguez-Martinez E. 2004. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility. *Theriogenology*. Volume 62, Issue 3, Pages 702-713, August 2004.
- Hammadeh M., Hassani S., Rosenbaum P., Schmidt W., Fischer H. 2008. Reactive oxygen species, total anti-oxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ICSI patients. *Arch Gynecol Obstet* 2008; 277: 51526.
- Handel M., Schimenti J. 2010. Genetics of mammalian meiosis: Regulation, dynamics and impact on fertility. *Nature Reviews Genetics* 11, 124-136.
- Harper M. 1988. Gamete and zygote transport. En: 'The physiology of reproduction, editado por E. Knobil y I.D. Neilí. New York: Raven press, 1988, p. 103-134.
- Hernandez, A. 2006. Fisiología de los animales. Segunda edición. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana Madrid-España.
- Hernández, F., Nava T. y Vílchez V. 2010. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos bovinos para maduración in vitro. *Producción Agropecuaria/Sanidad Animal*, vol.3, 41 – 44.
- Herradón P, Quintela, Becerra L. 2007. In vitro fertilization: An alternative for genetic improvement in bovines. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*; vol. 15.
- Hillier S, Smits J, Eichenlaub-Ritter U. 2010. Folliculogenesis and oogenesis: from basic science to the clinic. *Molecular Human Reproduction*, Vol.16, No.9 pp. 617–620, 2010
- Hirshfield A. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Intern Rev Cytol* 1991; 124:43–101.

- Holt W. y Pickard A. 1999. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Rev Reprod* 4: 143-150.
- Huanca W. 2012. Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos como alternativas para la mejora genética VI Congreso Internacional de Ganadería de Doble Propósito – XVI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal.
- Huanca W., Condori R., Chileno M., García P., Cainzo J. y Becerra J. 2014. Effect of time of incubation on nuclear maturation and cleavage post in vitro fertilization of alpaca oocytes. *Rev Inv Vet Perú* 2014; 25(4): 468-476.
- Hunter R. y Rodriguez-Martinez H. 2004. Capacit.ation of mammalian spermatozoa in vivo, with a specific focus on events in the fallopian tubes. *Mol Reprod Dev.* 2004Feb, 67(2): 243-50.
- Hunter R. 1990. Fertilization of pig eggs in vivo and in vitro. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 40: 211-226.
- INEI. 2012. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Resultados. Definitivos. IV Censo Nacional Agropecuario. Ministerio de Agricultura. Lima-Perú.
- INTA, 2010. Memoria técnica curso de graduación: Producción in vitro y criopreservación de embriones bovinos. Argentina, Balcarce: 2010 Junio. pp. 1-85.
- Jamnongjit M. y Hammes S. 2005. Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. *Seminars Reproductive Medicine* 22 234-241.
- Kang S., Koyama K., Huang W., Yang Y., Yanagawa Y., Takahashi Y. y Nagano M. 2015. Addition of D-penicillamine, hypotaurine, and epinephrine (PHE) mixture to IVF medium maintains motility and longevity of bovine sperm and enhances stable production of blastocysts in vitro. *J. Reprod. Dev.* 61: 99–105.
- Kim, BK.; Lee S., Lee K., Lee, B., Han CH., Kim JH.; Lee CS. 2002. Effect of medium milieu on sperm penetration and pronuclear formation of bovine oocytes matured In Vitro. *Theriogenology* 57: 2093-2104. 2002.
- Kim N., Day B., Lim J., Lee H. y Chung K. 1997. Effects of oviductal fluid and heparin on fertility and characteristics of porcine spermatozoa. *Zygote*; 1997 5:61-65.
- Kim E., Noha E., Noh E., Park M., Park H., Lee D., Riu K. y Park S. 2013. Effect of Glycosaminoglycans on In vitro Fertilizing Ability and In vitro

Developmental Potential of Bovine Embryos. Asian-Aust. J. Anim. Sci. Vol. 26, No. 2 : 178-188 February 2013.

- Kochhar HS, Kochhar KP, Basrur PK, King WA. 2003. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of in vitro produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science*. 77: p33-49.
- Kordan W., Hoody D., Eriksson B., Fraser L., Rodriguez-Martinez H. y Strzezek J. 1998. Sperm motility inhibiting factor (SMIF) - a plasmatic peptide with multifunctional biochemical effects on boar spermatozoa. *Reproduction Domestic Animal*; 33: 34754.
- Lamirande, E., Pierre L. y Claude G. 1997. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular Human Reproduction* 3: 175–194.
- Lars J. 2005. por su ayuda en la preparación de este manual. Copyright MediCult a/s, Denmark.
- Le-Guinne B., Thibault C., Chupin D., Gérard M., Thibier M. 1988. Fecundation en vitro chez le mammiferes domestiques. *El y Ins*. 1988; 225:13-22.
- Leibfried M., Bavister B. 1982. Effects of epinephrine and hypotaurine on in-vitro fertilization in the golden hamster. *J ReprodFertil* 66, 87-93.
- Lima P., Oliveira M., Santos M., Reichenbach H., Weppert M., López F., Neto C., Goncalves P. 2006. Effect of retinoide and growth factor on in vitro bovine embryos produced unde chemically defined conditions. *Theriogenology*, 95:184-192.
- Ling, Z. y Lu K. 1990. Frequency of cleavage and development of in vitro bovine oocytes fertilized in different numbers in drops with different sperm concentrations. *Theriogenology*. Vol. 33, pp. 275.
- Lobo R. 2003. Early ovarian ageing: a hypothesis. What is early ovarian ageing. *Hum. Reprod*. 2003;18:1762-1764.
- Long C., Chase C., Balise J., Duby R. y Robl J. 1993. Effect of sperm removal time, sperm concentration and motility enhancers on fertilization parameters and development of bovine embryos in vitro. *Theriogenology* 1993; 39:261.
- Long C., Damiani P., Pinto-correia C., Maclean R., Duby R. y Robl J. 1994. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured in vitro under various conditions of fertilization. *J Reprod Fert* 1994; 102:361-369.

- Lopera R. 2009. Estudio de factores que influyen en la fecundación in vitro heteróloga entre espermatozoides de caprino y oocitos de bovino madurados in vitro. Tesis de master. Master Interuniversitaria en mejora genética animal y biotecnología de la reproducción. Universidad Politécnica de Valencia.
- López- Mazza .2010, Fac. Agronomía- E.E.B.R.
- Machaca M. 2013. 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 por Zarsosa TM y Culcay TI).
- Martino A., Mogas T., Palomo M., Paramio M. 1995. In vitro maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*, 43:473-485.
- Meizel S. y Working P. 1980. Further evidence suggesting the hormonal stimulation of hamster sperm acrosome reactions by catecholamines in vitro. *Biol. Reprod.* 1980; 22:211-216.
- Mengoni G. 2008. Camelids in ancient Andean societies: a review of the zooarchaeological evidence. *Quaternary International*. 185: 59-68.
- Miller G., Giedt D., Lester T., Pierson I., Rakes S. y Rorie R. 1992. Addition of bovine oviductal epithelial cells (BOEC) and/or penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) to bovine in vitro fertilization (NP) medium increases subsequent embryo cleavage rate. *Theriogenology* 37: 259.
- Miller G., Giedt D., Rakes J. y Rorie R. 1994. Addition of penicillamine, hypotaurine and epinephrine or bovine oviductal epithelial cells alone or in combination to bovine in vitro fertilization medium increases subsequent embryo cleavage rate. *Theriogenology* 1994; 41:689-696.
- Mortimer S. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction*. Update. 3(5): p403-439.
- Mortimer D. 2000. Sperm preparation methods. *Journal of Andrology* 2000; 21: 357-66.
- Morte M., Rodrigues A., Soares D., Rodrigues A., Gamboa S. y Ramalho-Santos J. 2008. The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. *Animal Reproduction Science* 2008; 106: 36-47.

- Nedambale T., Du F., Yang X. y Tian X. 2006. Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with mercaptoethanol. *Animal Reproduction Science*, 93:61-75.
- Nedambale T., Du F., Xu J., Chaubal S., Dinnyés A., Groen W., Faber D., Dobrinsky J., Yang X. y Tian X. 2006a. Prolonging bovine sperm-oocyte incubation in modified medium 199 improves embryos development rate and the viability of vitrified blastocysts. *Theriogenology*, 66:1951-1960.
- Niwa K y Ohgoda O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on in vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology* 1988; 30:733-74.
- Otoi T., Yamamoto K., Koyama N. y Suzuki T. 1995. In vitro Fertilization and Developmental of Immature and Mature Bovine Oocyte Cryopreserved by Ethylene Glycol with Sucrose. *Cryobiology*, 32:455-460.
- Pacheco J., Vélez V. y Pezo D. 2016. Evaluation of the efficiency of interspecies embryo transfer between alpacas and llamas obtained through single ovulation. *Rev Inv Vet Perú* 2016; 27(1): 64-69.
- Pahuara L. y Naveros M. 2014. In vitro production of bovine embryos (*Bos taurus*) in two culture media. *Spermova* 2014; 4(1): 54 – 57.
- Palma G. 2001. *Biología reproductiva*. Ediciones Instituto nacional de Tecnología Agropecuaria. 1° edición Argentina 362 – 364.
- Palma G. 2008. *Biotecnología de la Reproducción*. 2ª ed. Argentina. 2008.
- Parrish J., Parrish J. y First N. 1984. Effect of swim-up separation and heparin pretreatment of frozen thawed spermatozoa on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Biology Reproduction*. 30 (Suppl 1): p112.
- Parrish, J., Susko-Parrish J., Winer M., First N. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod.*, 38:1171–1180.
- Parrish J., Krogenas A. y Susko-Parrish L. 1995. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or *percoll* method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*. 44: p859-869.
- Pereira D., Alves M., Rumpf D. y Rumpf R. 2005. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 63:1131-1141.

- Pérez D., Manuel G., Zevallos A., Juan P., Perez G. y Uri H. 2017. Comparison alpacas embryos cultivation system. *Rev. Investig. Altoandín*. 2017; Vol 19 Nro 2.
- Perez-Pé, R, Cebrian-Perez A, Muino Blanco T. 2001. Semen plasma proteins prevent cold shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology* 2001; 56: 425-34.)
- Pérez F. y Pérez J. 1985. Reproducción animal: Inseminación artificial y trasplante de embriones. Barcelona: Editorial Científico-Médica. 1985.
- Picton H. 2001. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* 55 1193-1210.
- Pincus G. y Enzmann E. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. *J. Exp. Med.* Vol. 62, pp. 665.
- Plachot M. 2000. Fertilization. *Human Reproduction*, 15:19-30.
- Quintanilla L., Huanca W., Córdova A., Ampuero A. y Benavides L. 2015. Effect of supplementation of maturation medium with cysteamine and two culture media (Ksoma and Sof) on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Rev Inv Vet Perú* 2015; 26(3): 462-46
- Quintero A. 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. España. p10.
- Rahman A., Abdullah R., Wan-Khadijah W. 2008. In vitro maturation of oocytes special reference to goat: A Review. *Biotechnology*. 7: 599-611.
- Ratto M., Berland M., Huanca W., Singh J. y Adams G. 2005. In vitro and in vivo maturation of llama oocytes. *Theriogenology*; 63: 2445-2457.
- Roca J., Rodríguez M., Gil M., Carvajal G., García E., Cuello C., Vázquez J. y Martínez E. 2005. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *Journal Andrology* 2005; 26: 15-24.
- Rosatti M., Beconi M. y Córdoba M. 2003. Proacrosin-acrosin activity in capacitated and acrosome reacted sperm from cryopreserved bovine semen. *Biocell* 28: 311-316. 2003.
- Ruiz A., Domínguez C., Martínez N., Pinto L., Drescher K. y Rossini J. 2008. *Zoot Trop* 26(2).
- Ruiz J. y Correa J. 2007. Maduración in vitro de ovocitos de alpaca y llama aspirados vía laparoscópica. I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en

- Camélidos Sudamericanos. 2007. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú.
- Sagirkaya H., Misirlioglu M., Kaya A., First N., Parrish J. y Memili E. 2007. Development potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Animal Reproduction Science*, 101:225-240.
- Saeki K., Hoshi M., Liebfried-Rutledge M. y First N. 1991. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol Reprod* 44: 256-26
- Saeki, K., Nao Y., Hoshi M. y Nagai M. 1995. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on in vitro fertilization of bovine oocytes in a protein – free medium. *Theriogenology*. Vol. 43, pp. 751-759.
- Salha O., Abusheika N. y Sharma V. 1998. Dynamics of human follicular growth and in vitro oocyte maturation. *Hum. Reprod. Update*. 1998; 4: 816–32.
- Salgado R., Rugeles C. y Álvarez J. 2005. Efecto de la heparina y de la concentración espermática sobre el porcentaje de fertilización de oocitos bovinos In Vitro. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 18. 2005.
- Sánchez F. y Smitz J. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1822 (2012) 1896–1912.
- Sansinema M., Taylor S., Taylor P., Denniston R., Godke R. 2003. Production of Nuclear Transfer Llama (*Lama glama*) Embryos From in vitro matured llama oocytes. *Cloning Stem cells* 2003.5: 191-198.
- Sansinema M., Taylor S., Taylor P., Schmidt E., Denniston R. y Godke R. 2007. In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic perminjection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Animal Reproduction Science*. 2007 99: 342-353.
- Sazorsa M. y Culcay I. 2014. Evaluación de la producción *in vitro* de embriones de alpacas (*Vicugna pacos*) en el laboratorio de Biotecnología de la Producción de la UTC. Latacunga-Ecuador. Pág. 9-10-11.
- Schellander K., Puhner P., Rracke B., Korb T. y Schleger W. 1990. In vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. *Theriogenology* 33: 477-485, 1990.
- Sierra R. y Olivera A. 2000. Interacción entre gametos. *Rev Col Cien Pec* 13. 2000.
- Sorensen J. 1982. Reproducción animal, principios y prácticas. México: Editorial McGraw Hill. 1982.

- Somfai T, Bodo S, Nagy S, Papp A, Ivancsics J, Baranyai B, Gocza E, Kovacs A. 2002. Effect of swim up and percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozenthawed bull spermatozoa. *Reprod Dom Anim.* 2002, 37:285-290
- Staigmiller R. y Moor R. 1984. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of bovine oocyte matured outside of follicle. *Gamet Research*, 9: 221-229.
- Susko-Parrish S., Wheeler M., Ax R., Pirst N. y Parrish S. 1990. Heeffect of penicillamine, hypotaurine, epirnephirine and sodium metabisulfite, on bovine ira vítro fertilization. *Theriogenology* 33: 333, 1990.
- Terreros M., Huanca W., Arriaga I., Ampuero A. 2015. Effect of three cryoprotectans on the cryopreservation of epididymal alpaca spermatozoa. *Rev Inv Vet Perú* 2015; 26(3): 420-426.
- Thérien I., Moreau R. y Manjunath P. 1998. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod.*, 59:768776.
- Thomas A., Meyers S. y Ball B. 2006. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology* 65: 1531– 1550.
- Thompson G. 1996. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology.* 45:27.
- Totey S., Singh G., Taneja M., Pacushe C. y Talwar G. 1992. In vitro maturarion, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (*Bubalus bubalis*). *J Reprod Fert* 1992; 95:597-607.
- Trasorras V. 2012. Producción de embriones in vivo e in vitro en camélidos sudamericanos. *Spermova.* 2012; 19-21.
- Urdaneta A. 2005. Utilización de compuestos tiol en la producción in vitro de embriones a partir de cabras prepúberes. Universidad Autónoma de Barcelona, España. 213 p.
- Urrego R., Zoot M., Ariel T., Zoot M., Olivera M. y MV. Dr. Sci Agr. Omar C., MVZ, MS. 2008. Simplification of oocytes fertilization during in vitro production of bovine embryos Simplificação da fecundação de oócitos durante produção in vitro de embriões de bovinos. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* 2008; 21:398-405

- Van Soom A. y Kruif A. 1996. Oocyte maturation, sperm capacitation and pre-implantation development in the bovine: Implications for in vitro production of embryos. *Reproduction in Domestic Animals*. Vol. 31(6), pp. 687-701.
- Vasquez T., Perez D., Olivera M. y Perez G. 2015. Effect of two methods of collection on the quantity and quality oocyte of alpacas (*Vicugna pacos*) and llamas (*Lama glama*) post mortem. *Rev. Investg. Alto andina*, Vol 3 N° 17.
- Velásquez P. 2004. Estudio del reconocimiento y la unión entre gametos en la especie bovina (*Bos Taurus*). Papel del ácido siálico en la interacción espermatozoide-zona pelúcida. Tesis. Universidad de Murcia. 2004.
- Vergos E. 1990. In vitro fertilization and embryo culture in cattle. Phd thesis. National University of Ireland. Dublin 1990.
- Vieira A., Mezzalira A., Barbieri D., Lehmkuhl R., Rubin M. y Vajta G. 2002. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology*, 45:91-94.
- Vilca 2008. Presentación Camélidos y Población San Pablo. Riobamba Ecuador. Riobamba-Ecuador.: s.n., 2008.
- Visconti P., Westbrook V., Chertihin O., Demarco I., Sleight S., y Diekman A. 2002. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J. Reprod. Immunol.*, 53: 133-150.
- Visesato M., Tapasi D., Maitreyi B. y Tapati C. 2007. Protein tyrosine phosphorylation of a heparin-binding sperm membrane mitogen (HBSM) is associated. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 352:404-409. 2007.
- Wang W., Niwa K. y Okuda K. 1991. In-vitro penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1991; 93:491-496.
- Wani N., Wani G., Khan M. y Salahudin S. 2000. Effect of oocyte harvesting techniques on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. *Small Ruminant Research* vol. 36,63-67.
- Ward F., Enight B., Rizos D., Boland M. y Lonergan P. 2002. Optimization of in vitro bovine embryo production: Effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*, 57:2105-2117

- Wu X., Gu W., Meng X. y Hecht N. 1997. The RNA-binding protein, TB-RBP, is the mouse homologue of translin, a recombination protein associated with chromosomal translocations. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5640–5645.
- Xu K., Yadav B., Rorie R., Plante L., Betteridge K. y King W. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviducal epithelial cells. *J. Reprod. Fert.* Vol. 94, pp. 33-43
- Yanagimachi R. 1988. -Mammaliaz fertilization. En: *me physiology of reproduction*, editado por E. Knobil y J.D. Neilí. New York: Raven Press, 1988, p. 135-186.
- Yang X., Kubota C., Susuki H., Taneja M., Bols P. y Presicce, G. 1998. Control of oocyte maturation in cows: biological factors-. *Theriogenology*. Vol. 49, pp. 471-482.
- Yang X., Kubota C. y Taneja M. 1998b. Control of oocyte maturation in cows. Biological factors. *Theriogenology*, 49:471-482.
- Zhou G., Liu G., Meng Q., Liu Y., Hou Y., Wang X., Li N. y Zhu S. 2009. Tetraspanin CD9 in bovine oocytes and its role in fertilization. *J Reprod Dev.*, 55(3):3058.

[www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/5613/mdit2de5.pdf?sequence=2](http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/5613/mdit2de5.pdf?sequence=2)

<http://www.inia.gob.pe/>

<http://www.unesur.edu.ve/unidades/investigacion/revistas.html/16:38/04-11-2013>

# ANEXOS

## ANEXO 01. PREPARACIÓN DE LOS STOCKS PARA LOS MEDIOS

**Tabla 01: Glutamina**

Glutamina	0,146 g
Agua miliQ	10 ml
Separar en alícuotas de 20 y 200 ul y congelar a 4°C.	

**Tabla 02: Piruvato**

Piruvato	0,11g
Agua miliQ	10 ml
Separar en alícuotas de 110 ul y congelar a 4°C.	

**Tabla 03: Myoinositol**

Myoinositol	500 mg
Agua miliQ	10 ml
Separar en alícuotas de 1ml y congelar a 4°C.	

**Tabla 04: Fb-Estradiol**

FB-Estradiol	222 mg
Agua miliQ	10 ml
Separar en alícuotas de 30 ul y congelar a 4°C.	

**Tabla 05: Ácido Cítrico**

Ácidocítrico	1 g
Agua miliQ	10 ml
Separar en alícuotas de 100 ul y congelar a 4°C.	

**Tabla 06: FSH-LH**

FSH	0,5mg
LH	0,5mg
TCM-199	1ml
Separar en alícuotas de 20ul y congelar a 4°C.	

**Tabla 07: Medio base: TALP-FIV (50ml)**

NaCl	0.3331g
KCl	0.0119 g
CaCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O	0.0147g
MgCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O	0.0051g
NaHCO <sub>3</sub>	0.105 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0018 g
Lactato de Na	0.093 ml
Rojo fenol	0.0005g
Ajustar PH 7.4	

**Tabla 08: Medio base: TALP- SPERM (40ml)**

NaCl	0.2308 g
KCl	0.0024 g
CaCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O	0.01176 g
MgCl <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O	0.0089 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.084 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.00168 g
Lactato Na	0.148 ml
Hepes	0.10412 g
Ajustar PH 7.4 y filtrar	

**Tabla 09: Medio base: SOF (200ml)**

Agua milliQ	200ml
NaCl	1258.2 mg
KCl	106.8 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	32.4 mg
CaCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O	49.6 mg
MgCl <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O	19.2 mg
NaHCO <sub>3</sub>	421.2 mg
Rojo fenol	0.28 mg
Lactato de Na	94.12 µl
Filtrar y almacenar a 4 °C hasta añadir aditivos	

**ANEXO 02. PREPARACIÓN MEDIOS PARA LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES**

**Tabla 10: Preparación de la solución salina fisiológica  
Concentración de 0.9% 1L.**

NaCl	9.g
Agua destilada	1000.ml
Gentamicina	1.ml

**Tabla11: Preparación del medio de manipulación modificado (100ml)**

INGREDIENTES	UNIDAD	100ml	15ml	10m l
SSF	MI	90	13,5	9
SFB	MI	10	1,5	1
GENTAMICINA	MI	100	15	10

**Tabla 12: Preparación del medio de maduración  
Medio Base: (10ml) Medio de trabajo: (10ml)**

TCM-199	10 ml
Piruvato	60 µl
SFB	1 ml
FSH-LH	50 µl
Glutamina	20 µl
IGF	10 µl
Estradiol	10 µl
Gentamicina	10 µl

Nota: Todo medio preparado debe de ser filtrado.

**Tabla 13: Preparación del medio de fertilización  
Medio de trabajo: (10ml)**

TALP-FIV	10 ml
Piruvato	100 µl
Gentamicina	10 µl
BSA-FAF	30 mg

NOTA: después de la preparación se filtra el medio.

**Tabla 14: Preparación del medio de capacitación**

**Medio de trabajo: (50ml)**

<b>TALP-SPERM</b>	<b>50 ml</b>
Piruvato	500 $\mu$ l
Gentamicina	50 $\mu$ l
BSA Fracción V	300 mg

**Tabla 15: Preparación del medio de cultivo**

**Medio de trabajo: (10ml)**

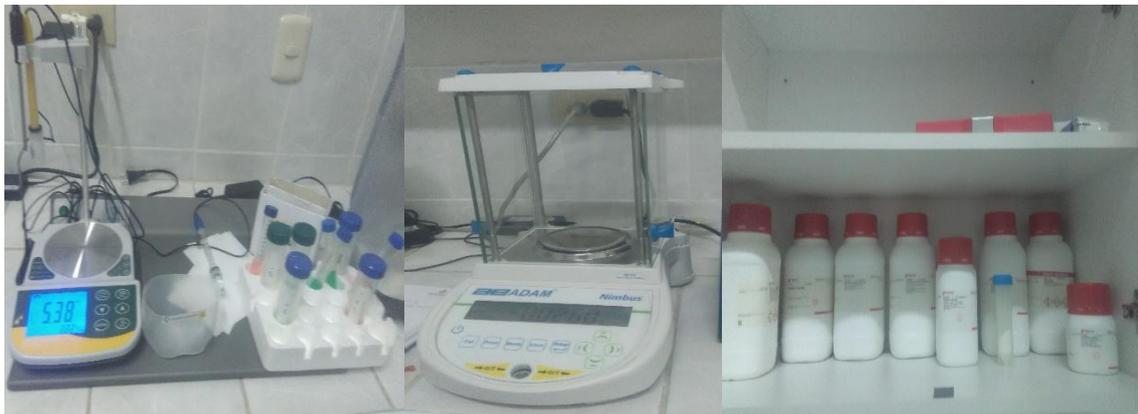
<b>SOF Stock</b>	<b>10ml</b>
Piruvato	400 $\mu$ l
Glutamina	200 $\mu$ l
AAE	2000 $\mu$ l
AANE	1000 $\mu$ l
EGF	100 $\mu$ l
Ac. Cítrico	100 $\mu$ l
Myoinositol	1000 $\mu$ l
SFB	2000 $\mu$ l
Gentamicina	100 $\mu$ l
BSA- FAF	0.3 g

Importante: estas deberán permanecer en la incubadora al menos una hora antes de introducir los cigotos fertilizados a cultivar.

### ANEXO 03. REGISTRO FOTOGRÁFICO DE MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO



**Fotografía 01.** Recolección de material biológico del matadero Pilpichaca-Huancavelica



**Fotografía 02.** Equipos e insumos para la preparación de medios Stocks para FIV.

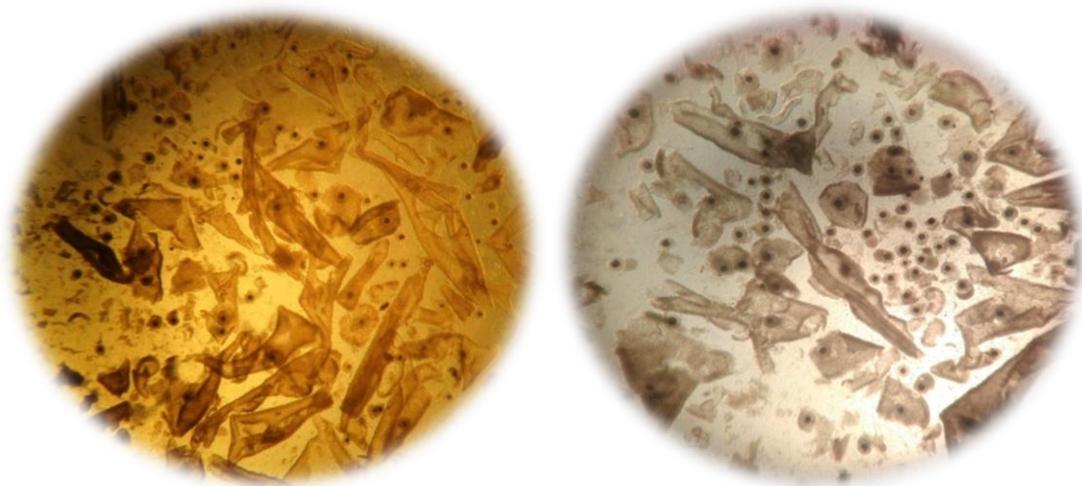


**Fotografía 03.** Preparación de los Stocks para los medios.

**ANEXO 04. REGISTRO FOTOGRÁFICO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN  
IN VITRO DE EMBRIONES**



**Fotografía 04.** Recuperación de ovocitos por la técnica Slicing.



**Fotografía 05.** Selección de ovocitos de la categoría I, II y III



**Fotografía 06.** Maduración de ovocitos en medio TCM-199



**Fotografía 07.** Selección de espermatozoides por *percoll* 90%:45% de densidad.



**Fotografía 08.** Incubación de presuntos cigotos en el medio de cultivo SOF con mezcla de gases por 7 días.

## ANEXO 05. ANÁLISIS DE VARIANZA

**Tabla 16. Análisis de variancia (ANVA) del clivaje**

FUENTES DE VARIACION	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F Cal.	F tab. (0.05)
<b>TRATAMIENTO</b>	3	37.3000000	12.4333333	4.06	0.0139
<b>ERROR</b>	36	110.2000000	3.0611111		
<b>TOTAL</b>	39	147.5000000			

**Tabla 17. Análisis de varianza (ANVA) de producción de mórulas**

FUENTES DE VARIACION	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F Cal.	F tab. (0.05)
<b>TRATAMIENTO</b>	3	88.4750000	29.4916667	5.22	0.0043
<b>ERROR</b>	36	203.3000000	5.6472222		
<b>TOTAL</b>	39	291.7750000			

**Tabla 18. Análisis de varianza (ANVA) de producción de blastocistos**

FUENTES DE VARIACION	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F Cal.	F tab. (0.05)
<b>TRATAMIENTO</b>	3	4.3000000	1.4333333	2.02	0.1291
<b>ERROR</b>	36	25.6000000	0.7111111		
<b>TOTAL</b>	39	29.9000000			

**Tabla 19. Análisis de varianza (ANVA) de producción de embriones**

FUENTES DE VARIACION	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F Cal.	F tab. (0.05)
<b>TRATAMIENTO</b>	3	127.0750000	42.3583333	6.62	0.0011
<b>ERROR</b>	36	230.3000000	6.3972222		
<b>TOTAL</b>	39	357.3750000			

**Tabla 20. Análisis de varianza (ANVA) de producción de embriones de calidad I**

FUENTES DE VARIACION	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F Cal.	F tab. (0.05)
<b>TRATAMIENTO</b>	3	98.2000000	32.7333333	3.93	0.0160
<b>ERROR</b>	36	300.2000000	8.3388889		
<b>TOTAL</b>	39	398.4000000			

**Tabla 21. Análisis de varianza (ANVA) de producción de embriones de calidad II**

<b>FUENTES DE VARIACION</b>	<b>GL</b>	<b>SUMA DE CUADRADOS</b>	<b>CUADRADO MEDIO</b>	<b>F Cal.</b>	<b>F tab. (0.05)</b>
<b>TRATAMIENTO</b>	3	4.50000000	1.50000000	0.65	0.5897
<b>ERROR</b>	36	83.40000000	2.31666667		
<b>TOTAL</b>	39	87.90000000			

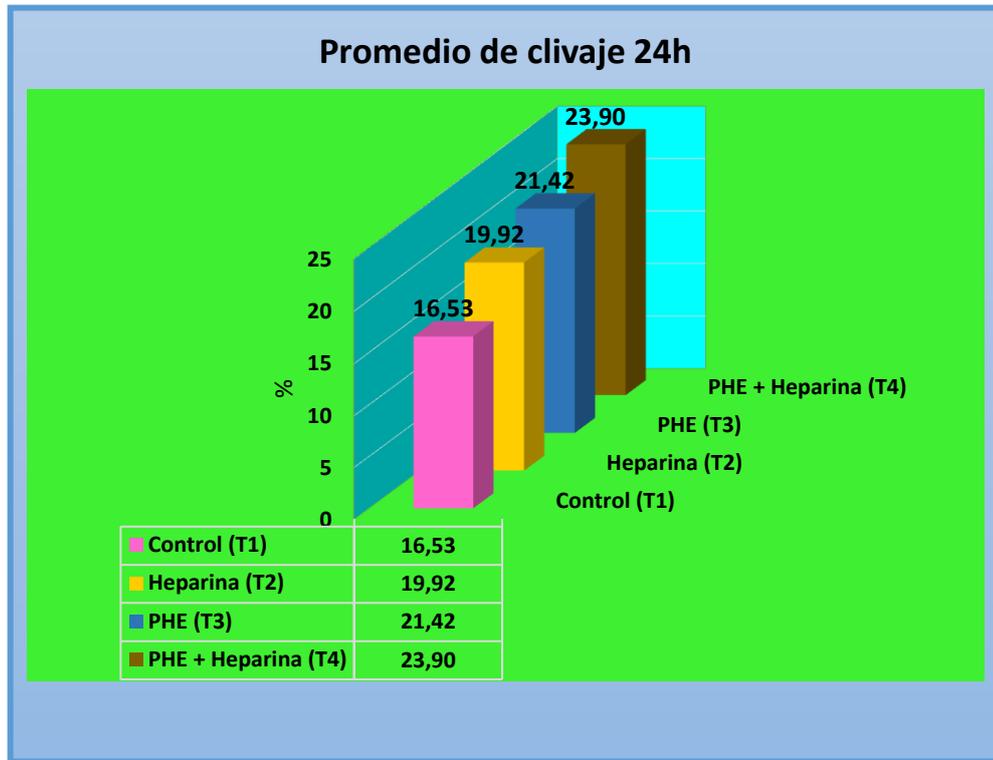
**Tabla 22. Análisis de varianza (ANVA) de producción de embriones de calidad III**

<b>FUENTES DE VARIACION</b>	<b>GL</b>	<b>SUMA DE CUADRADOS</b>	<b>CUADRADO MEDIO</b>	<b>F Cal.</b>	<b>F tab. (0.05)</b>
<b>TRATAMIENTO</b>	3	1.00000000	0.33333333	1.28	0.2971
<b>ERROR</b>	36	9.40000000	0.26111111		
<b>TOTAL</b>	39	10.40000000			

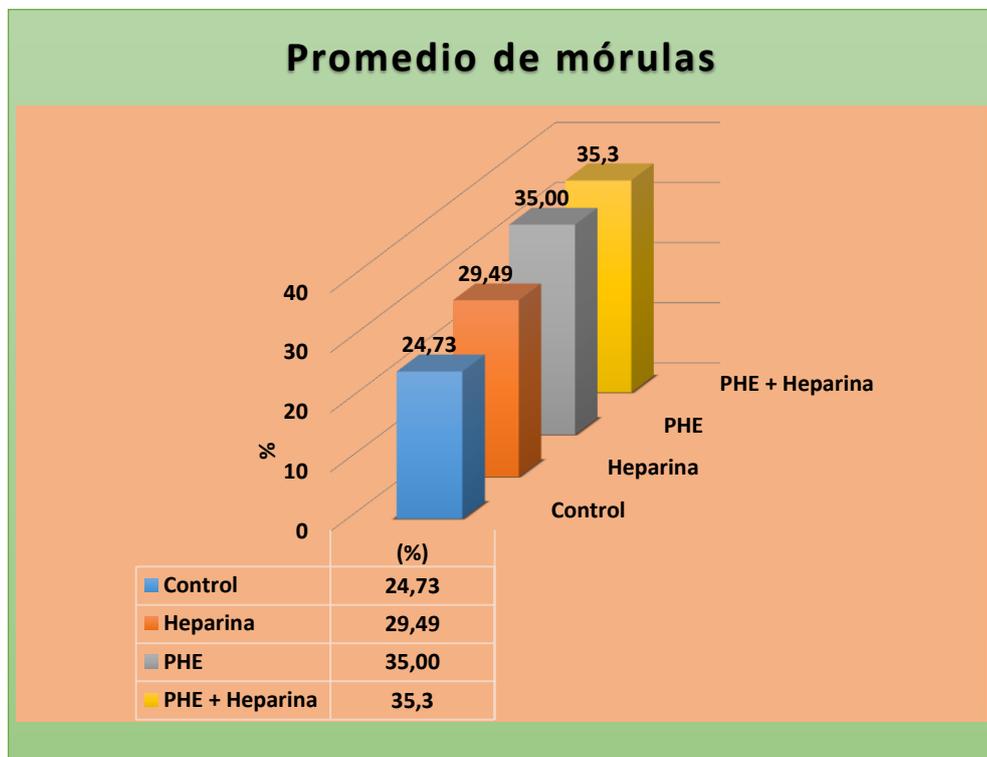
**Tabla 23. Análisis de varianza (ANVA) de producción de embriones de calidad IV**

<b>FUENTES DE VARIACION</b>	<b>GL</b>	<b>SUMA DE CUADRADOS</b>	<b>CUADRADO MEDIO</b>	<b>F Cal.</b>	<b>F tab. (0.05)</b>
<b>TRATAMIENTO</b>	3	0.67500000	0.22500000	0.66	0.5829
<b>ERROR</b>	36	12.30000000	0.34166667		
<b>TOTAL</b>	39	12.97500000			

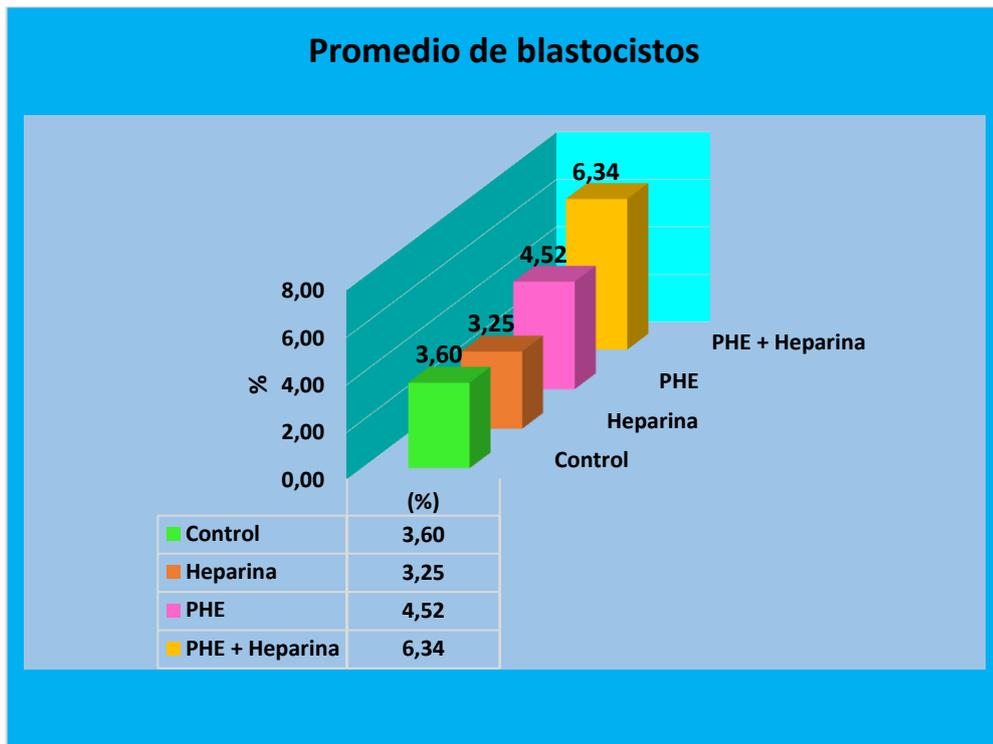
## ANEXO 06. RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN



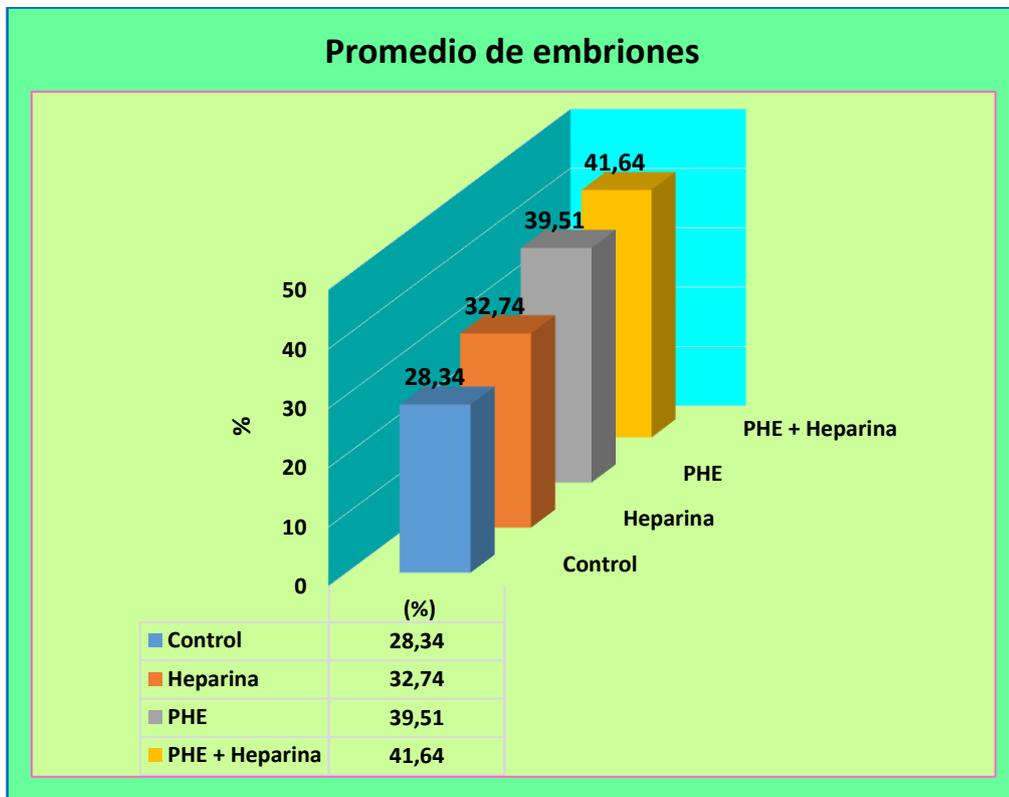
**Figura 01.** Promedio de clivaje a las 24 horas



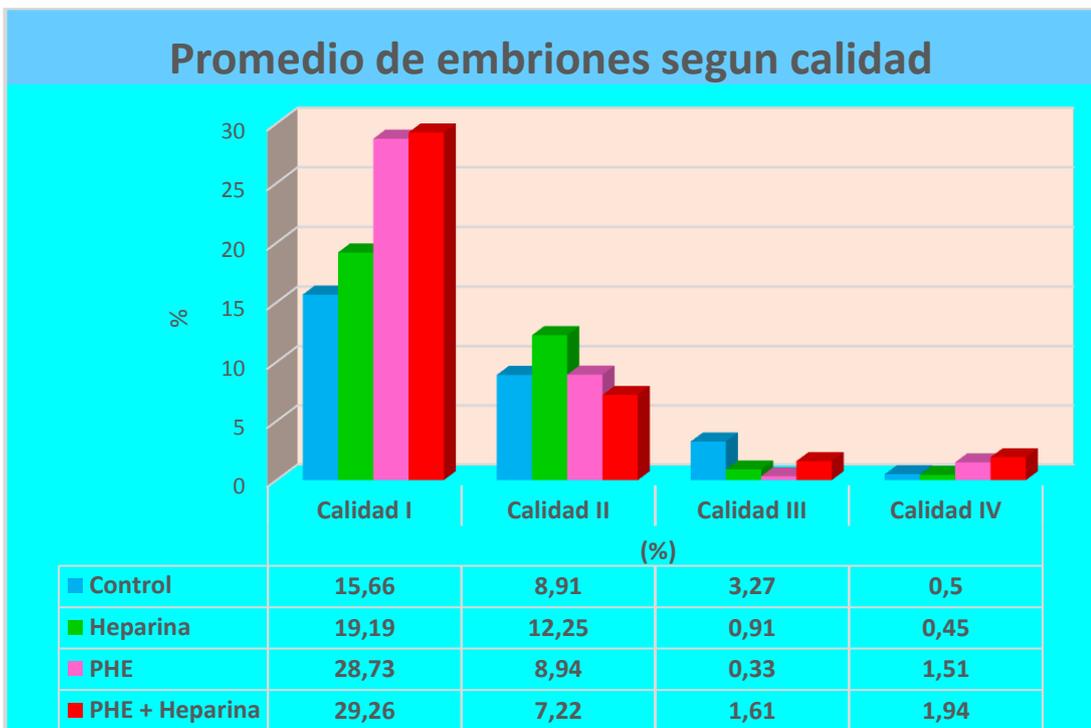
**Figura 02.** Promedio de mórulas suplementados con PHE y Heparina.



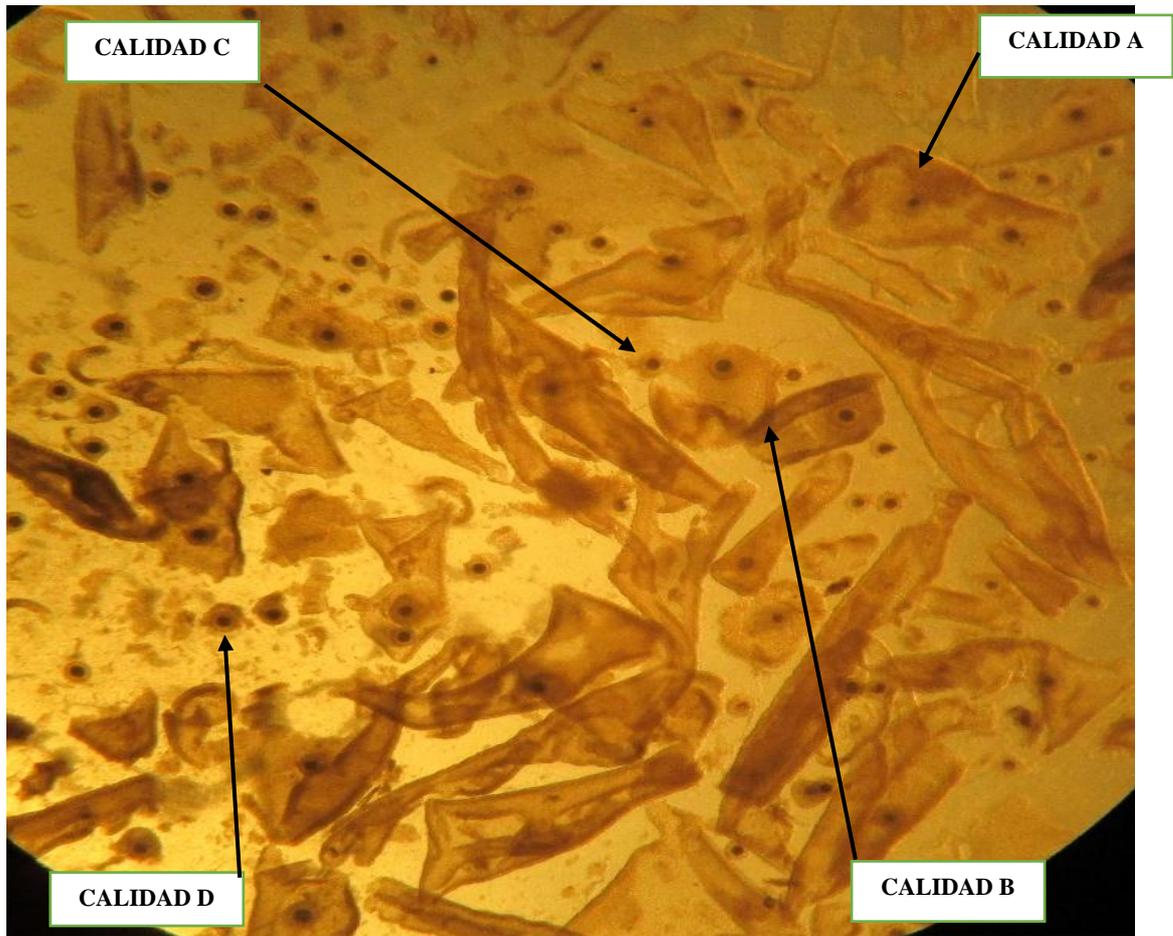
**Figura 03.** Promedio de blastocistos suplementados con PHE y Heparina.



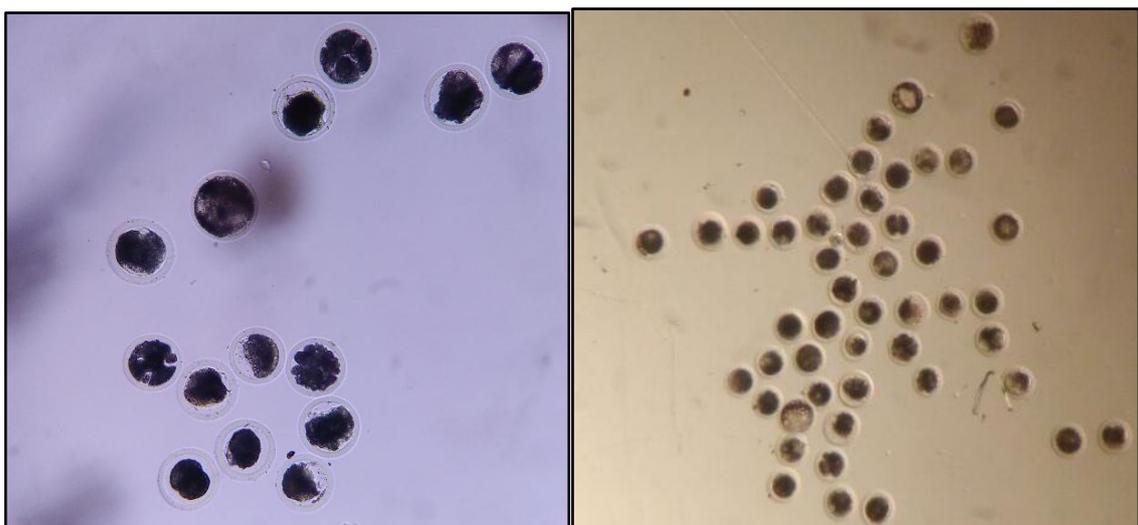
**Figura 04.** Promedio de embriones suplementados con PHE y Heparina.



**Figura 05.** Promedio de producción de embriones según calidad.



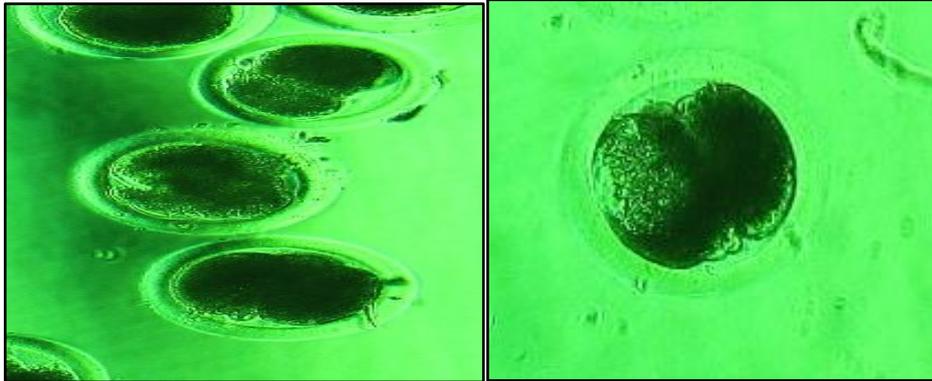
**Fotografía 09.** Clasificación de ovocitos en I, II, III y IV categorías



**Fotografía 10.** Desarrollo embrionario en diferentes estadios producidos por FIV.

## ANEXO 07. CLASIFICACIÓN DE EMBRIONES

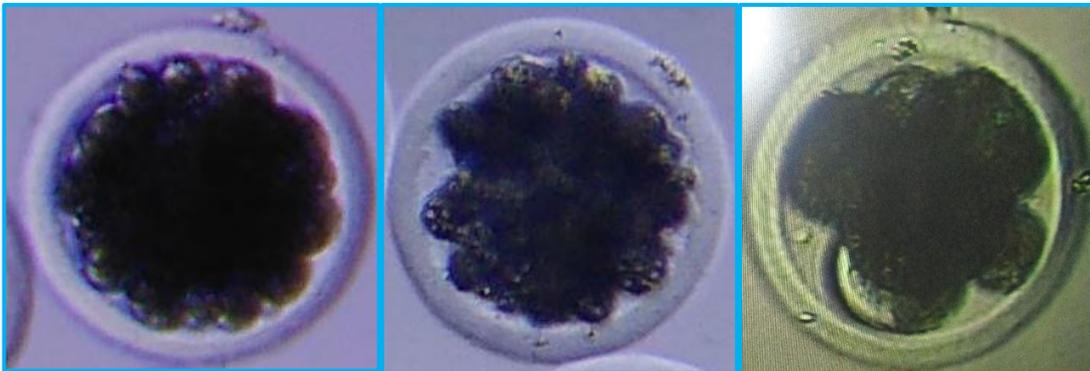
Clivaje a los 24h



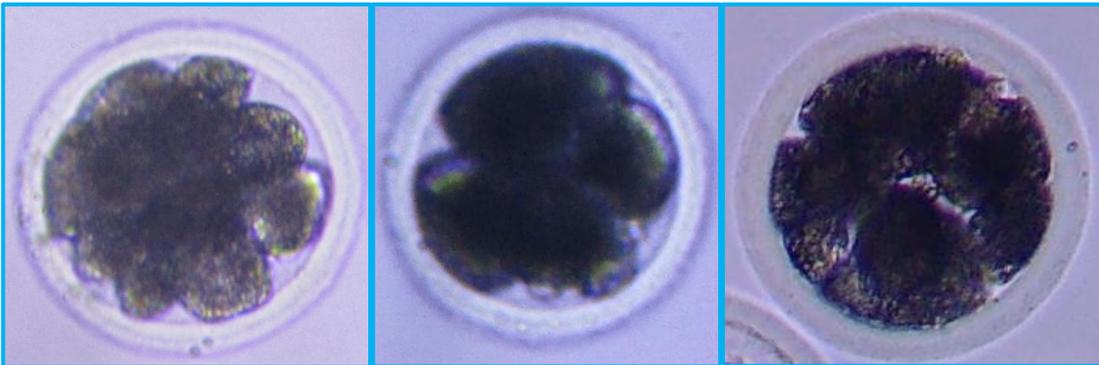
Calidad de mórulas

Mórula temprana

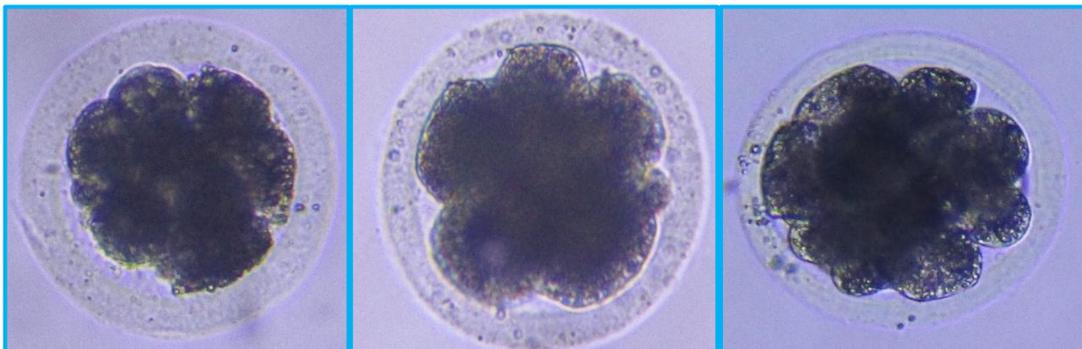
Calidad I



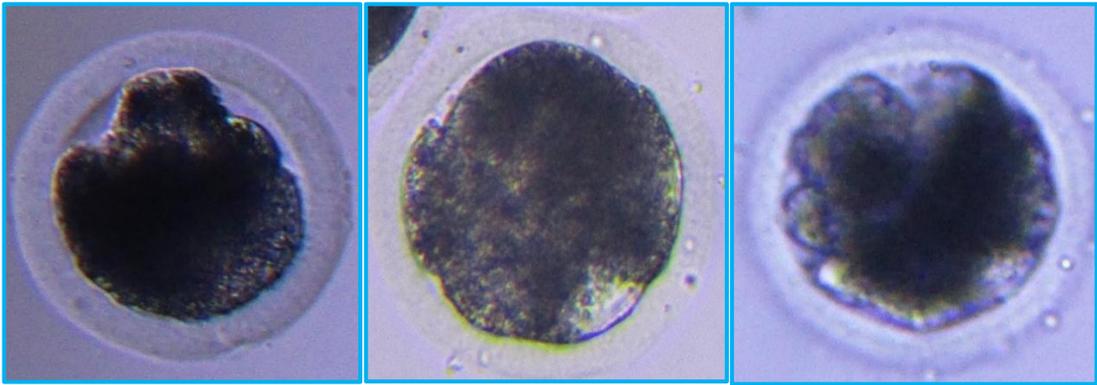
Calidad II



Calidad III

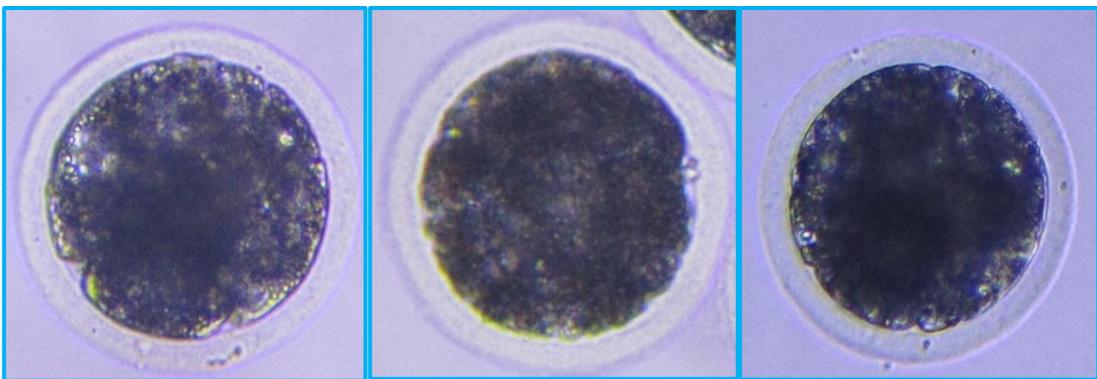


Calidad IV

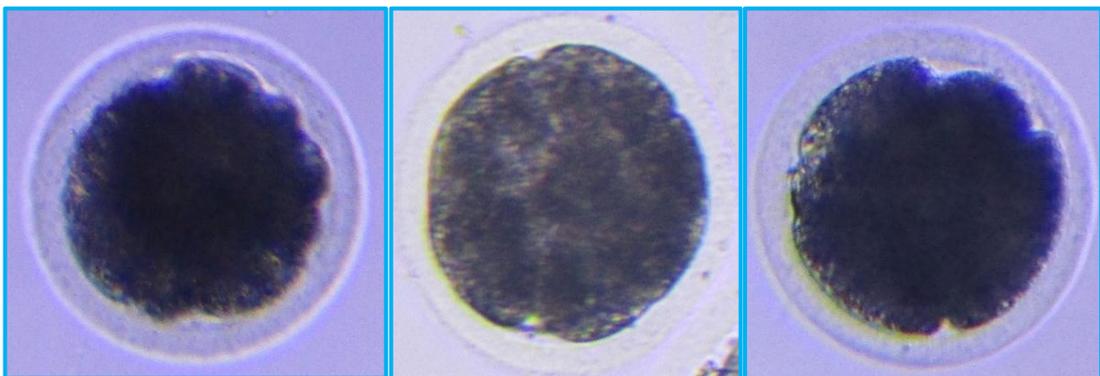


**Mórula compacta**

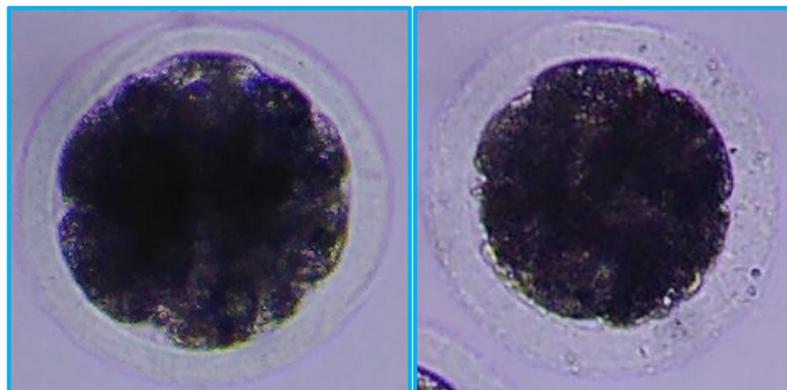
Calidad I



Calidad II



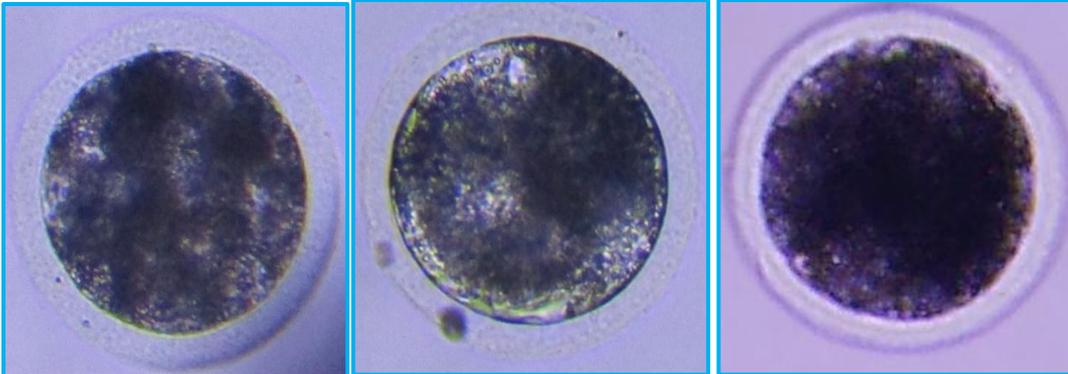
Calidad III



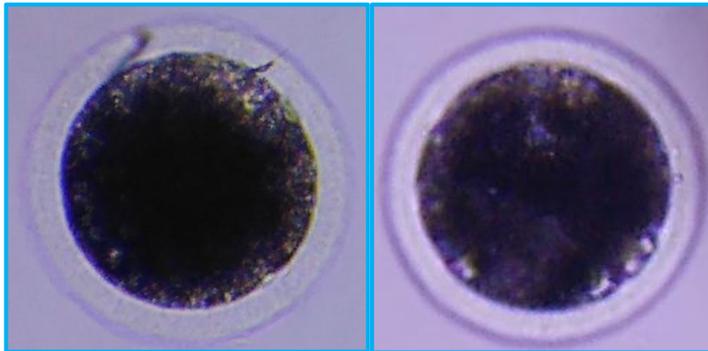
**Calidad de blastocistos**

**Blastocisto temprano**

Calidad I

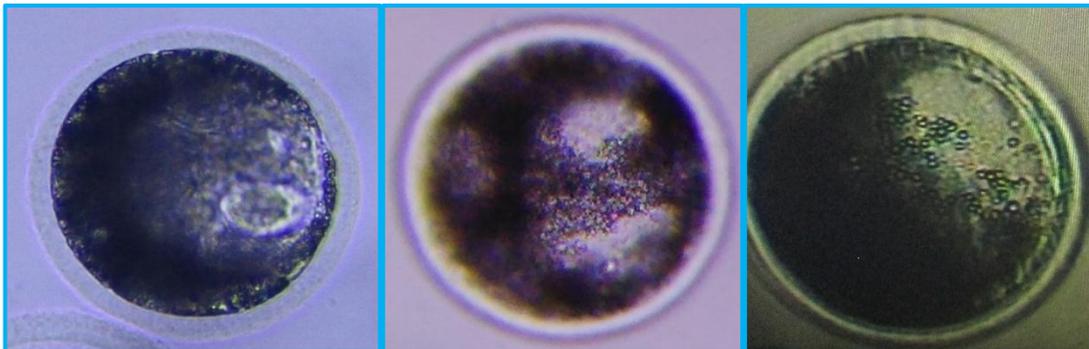


Calidad II

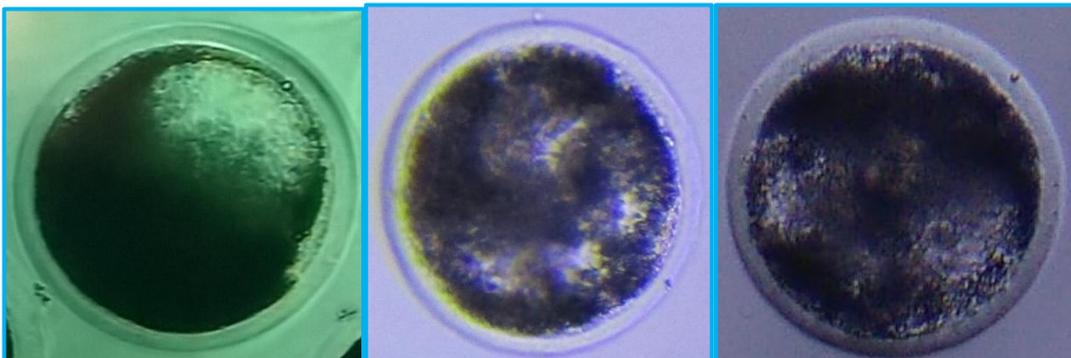


**Blastocisto expandido**

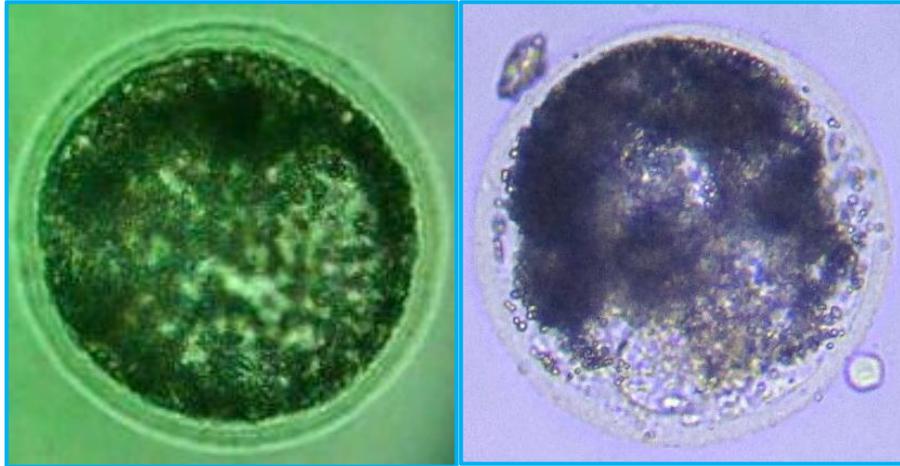
Calidad I



Calidad II



Calidad III



Calidad III

