

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN  
CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Evaluación del tiempo de maduración de ovocitos para  
la producción *in vitro* de embriones de *Lama pacos*  
“alpaca”. Ayacucho 2009.

Tesis para optar Título Profesional de Bióloga en la  
Especialidad de Biotecnología

Presentado por:

Bach. OCHANTE PICHARDO RAQUEL

AYACUCHO- PERÚ

2010

A María, Ángeles y Pedro

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, casa superior de estudios que imparte cultura, ciencia y tecnología.

A los profesores, de la Facultad de Ciencias Biológicas, por sus orientaciones y valiosos consejos durante mi formación.

Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Estación Experimental Agraria Canaán de Ayacucho, institución que apoyó a la ejecución del proyecto de tesis.

Al Mg. Fidel Rodolfo Mujica Lengua, por su asesoramiento en la realización de la presente tesis.

Al Dr. Marco Cabrera González investigador agrario del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA-Ayacucho), por su apoyo durante la realización del trabajo de tesis.

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron en la ejecución de la presente tesis.

## ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Algunas consideraciones sobre el origen de las alpacas	4
2.2. Aspectos generales de la alpaca	7
2.3. Anatomía reproductiva de la alpaca	7
2.4. Pubertad de la alpaca	10
2.5. Fisiología reproductiva de la alpaca	10
2.6. Obtención de ovocitos	14
2.7. Recuperación de complejos cúmulo-ovocito	15
2.8. Selección de ovocitos para maduración	16
2.9. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos (MIV)	17
2.10. Factores importantes para la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos	18
2.11. Fecundación <i>in vitro</i>	20
2.12. Vagina artificial	20
2.13. Selección de espermatozoides	21
2.14. Capacitación de espermatozoides	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Ubicación	23
3.2. Población y muestra	23
3.3. Recolección y transporte de ovarios <i>post mortem</i> de alpaca	23
3.4. Recuperación y selección de ovocitos	24
3.5. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos	24
3.6. Método de recuperación de espermatozoides	26
3.7. Lavado de espermatozoides	26
3.8. Cultivo de embriones	27
3.9. Evaluación de la tasa de desarrollo	27
3.10. Técnicas de procesamiento y análisis estadístico de datos	27
IV. RESULTADOS	28
V. DISCUSIÓN	41
VI. CONCLUSIONES	47
VII. RECOMENDACIONES	48
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	53



**Evaluación del tiempo de maduración de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones de *Lama pacos* "alpaca". Ayacucho 2009.**

**Autor:** Raquel Ochante Pichardo

**Asesores:** Mg. Fidel Rodolfo Mujica Lengua

Dr. Marco Antonio Cabrera González

**RESUMEN**

La alpaca es un recurso animal importante en el desarrollo económico de la región y del país, por ende, asegurar su reproducción y mejoramiento genético es de importancia para los productores alpaqueros. Se sabe, que las alpacas pueden tener 4 a 5 crías en toda su vida reproductiva, limitándose así el mejoramiento genético por la poca cantidad de crías que se obtiene de una hembra de alta calidad genética expresada en su elevada calidad de fibra. Sin embargo, con la aplicación de biotecnologías reproductivas como la fecundación *in vitro* se puede lograr tener una mayor eficacia reproductiva en esta especie, superando de esta manera la producción de crías logradas por hembra donante.

El objetivo principal del presente trabajo es el de evaluar tres tiempos de maduración de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones de alpacas, este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán de Ayacucho, para lo cual se recolectó 203 ovarios obtenidos del Camal Municipal de Pilpichaca y trasladadas en solución salina fisiológica a 37° C al laboratorio mencionado. Canaán luego se realizó la aspiración de los folículos obteniendo 909 ovocitos, equivalente a un promedio de 4,5 ovocitos/alpaca, luego se realizó la selección de ovocitos y la maduración *in vitro* (MIV) por un tiempo de 24, 26, 48 y 72 h obteniéndose a las 24 y 26 h una media de 27,43, a las 48 h una media de 25,0 y a las 72 h una media de 23,71, seguidamente se realizó la fertilización *in vitro* con semen fresco obtenido a partir de una colecta con vagina artificial, el cual fue capacitado y seleccionado por la técnica de Swin up. Se obtuvo como resultado que la tasa de segmentación de ovocitos en división 2 a las 24 h es de 19,28%, a las 26 h un 21,86%, a 48 h un 1,86% y a las 72 h un 0,43. La tasa de segmentación de ovocitos en división 4 a las 24 h fue 14%, a 26 h un 19%, a 48 h un 0,29% y a las 72 h 0%. La tasa de segmentación de mórula a las 24 h fue de 4,86%, a 26 h un 9,57%, a 48 y 72 h no se obtuvieron resultado alguno. La tasa de blastocisto no se llegó a obtener. En conclusión se evaluó 4 tiempos de maduración y el tiempo más adecuado para la MIV es de 26 h, seguida de 24 h.

**Palabras clave:** Ovocitos, maduración *in vitro*, fecundación *in vitro*, embriones, alpaca.

## I. INTRODUCCIÓN

La alpaca (*Lama pacos*) constituye un recurso genético de gran importancia social, económica, cultural y científica para el Perú y en algunas zonas como en la región de Ayacucho, estas se localizan entre los 4000 y 4800 m.s.n.m.

Hoy en día, la producción de camélidos sudamericanos cobra gran importancia en el entorno socio-económico en los productores de las regiones altoandinas del Perú, aprovechando de esta manera los subproductos de estas especies como la fibra, carne, pieles y estiércol (Cárdenas y col., 1999).

Sin duda la aplicación de la biotecnología reproductiva en parte puede contribuir a superar los bajos índices de fertilidad y aportar al mejoramiento genético en estas especies sobretodo en la multiplicación de animales de alto valor productivo así convirtiéndose en reproductores para los criadores de camélidos sudamericanos en nuestro país.

Por otro lado, el desarrollo de biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial, la transferencia de embriones y recientemente el desarrollo de protocolos para la fecundación *in vitro*, han contribuido a la mejora genética en muchas especies domésticas. Sin embargo la aplicación de la

biotecnología reproductiva se encuentra en un estado formativo en especies domésticas de camélidos sudamericanos.

A pesar de esta realidad, en la actualidad existen grupos de investigación sobre la fisiología reproductiva de los camélidos sudamericanos en distintos países. Además, estos conocimientos están permitiendo la investigación en la aplicación de la biotecnología reproductiva, como la sincronización de la dinámica folicular, la inseminación artificial, la transferencia de embriones, la fertilización *in vitro* y en los últimos años la inyección intracitoplasmática de espermatozoides y la transferencia nuclear. Todos estos avances permiten cada día entender mejor los procesos involucrados en la función reproductiva de estas especies.

La aplicación de la biotecnología reproductiva hoy en día, es una alternativa en la mejora de los camélidos sudamericanos, puesto que de esta manera se acorta el tiempo de generación y se acelera el mejoramiento genético. Todo esto por las técnicas de fecundación *in vitro* (FIV) lo que motivó para trabajar con ovarios de camal hasta establecer el tiempo óptimo para la maduración y fecundación *in vitro* (FIV) de ovocitos de alpacas, para que en un futuro se pueda extraer de una alpaca de excelente calidad genotípica como fenotípica.

Al establecer la técnica adecuada en la producción de embriones por maduración *in vitro* (MIV) y fecundación *in vitro* (FIV) permitirá al productor alpaquero, tener una alternativa en la mejora de su rebaño acortando tiempo y dinero para lograr un rebaño de excelente calidad que le brinde mejores posibilidades de vida.

Para el presente trabajo de investigación se tuvo como objetivos:

- Evaluar tres tiempos de maduración de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones de alpacas.

- Seleccionar el tiempo más adecuado de maduración de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones de alpacas.
- Establecer la tasa de segmentación y de blastocisto en la producción *in vitro* de embriones de alpacas.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Algunas consideraciones sobre el origen de las alpacas

**2.1.1. Clasificación:** Según Linneaus, 1758, la alpaca queda establecida en la categoría taxonómica (Fernández-Baca, 1991):

Reino	: Animalia
Subreino	: Eumetazoa
Rama	: Bilateria
Filo	: Chordata
Subfilo	: Vertebrata
Superclase	: Gnathostomata
Clase	: Mamíferos
Orden	: Artiodactyla
Suborden	: Tilopoda
Familia	: Camelidae
Tribu	: Lamini
Género	: Lama
Especie	: <i>Lama pacos</i>
Nom. común	: Alpaca
Razas	: Suri, Huacaya

Los representantes más antiguos de la tribu Lamini son los fósiles del género *Plianchenia* encontrados en los llanos de América del Norte y con una antigüedad de 9 a 11 millones de años (Wheeler, 1991).

El género *Plianchenia* dio origen a los *Hemiauchenia*, los cuales se desplazaron hacia América del Sur al final del Plioceno y comienzos del Pleistoceno, hace unos 3 millones de años. Se estima que los *Hemiauchenia* dieron origen a los géneros *Lama* y *Vicugna* un millón de años más tarde, desapareciendo éstas del continente norteamericano hace unos 10 mil años, quedando sólo las especies *Lama* y *Vicugna*, como únicos sobrevivientes de la tribu Lamini (Wheeler, 1991).

### **2.1.2. Distribución y ecología de la alpaca**

La distribución actual de la alpaca se produce en la historia de los países andinos, desde su domesticación hace 6000 años en las punas centrales del Perú. La crianza de alpacas fue llevado por el hombre a los valles interandinos hace 3800 años; según las evidencias procedentes de los sitios arqueológicos de Kotosh-Huánuco (1 900 msnm) y de Huacatoma, Cajamarca (2 700 msnm). Finalmente es probable que se extendiera a las costas del norte y del sur hace 1000 a 900 años. A consecuencias de la invasión española en el siglo XVI, tanto las alpacas como las llamas fueron diezmadas y desplazadas de la costa y los valles interandinos hacia las elevaciones más altas de los andes donde se encuentra hoy.

Actualmente la distribución de la alpaca se extiende desde Cajamarca y el norte del departamento de Ancash hasta el lago Popo en Bolivia con un número muy reducido de animales en el norte de Chile y el noreste de Argentina. En estas zonas se localizan a altitudes superiores a los 4 000 msnm. (Fernández-Baca, 1991).

### 2.1.3. Fenotipos de la alpaca

La alpaca ha sido seleccionada como productora de fibra durante un periodo de por lo menos 3 mil años, durante este proceso hubo un incremento en la longitud de la fibra y modificación en su forma, dando origen a los fenotipos Huacaya y Suri. Es probable dado el extremo control ejercido sobre la reproducción durante el incanato que estos tipos sean la herencia de razas antiguas las cuales han perdido su integridad a causa de la conquista española. (Fernández-Baca, 1991).

Alrededor del 90% de las alpacas pertenecen a la variedad Huacaya caracterizado por un abundante crecimiento de la fibra que cubre el cuerpo, piernas y cuello además, de la frente y mejillas de la cara formando copete y patillas que llegan a cubrir los ojos. La cara y las cuatro patas están cubiertas de pelo corto. La fibra es rizada dando al animal una apariencia esponjosa semejante al ovino de la raza Corriedale. El crecimiento anual de la fibra es de 9 a 12 cm. de longitud con un promedio de 11,56 cm. con una densidad folicular promedio de 15,93 por  $\text{mm}^2$ . En contraste, la fibra del Suri es ligeramente ondulado, mas sedosa, lacia y de mayor crecimiento longitudinal alcanzando de 10.40 a 20 cm. y con un promedio de 14,58 cm. por año. Con densidad folicular promedio de 17,29 por  $\text{mm}^2$  la distribución corporal de la fibra es la misma que en Huacaya pero debido a su estructura cae desde la línea media de la espalda a ambos lados del cuerpo dando la apariencia de un ovino Lincoln, y llegando hasta el suelo si el animal no es esquilado. Además, de los fenotipos Huacaya y Suri también existen animales con fibra de característica intermedia (Fernández-Baca, 1991).

La coloración del pelaje de la alpaca es mucho más uniforme que en la llama indicando que es un producto de selección para la producción de fibra. Varía desde el blanco al negro y marrón incluyendo todos los tonos intermedios.

La demanda industrial por fibra blanca en los últimos años ha contribuido a la eliminación de la variación de colores en las poblaciones andinas (Fernández-Baca, 1991).

## **2.2. Aspectos generales de la alpaca**

La crianza de alpacas constituye una actividad económica de vital importancia para un amplio sector de la población altoandina de Perú, Bolivia, Argentina, Chile y Ecuador. Se estima que alrededor de 500 mil familias campesinas de la región andina dependen directamente de la actividad con camélidos sudamericanos, además de otras que se benefician indirectamente de ella (Ruiz, 2005); aprovechando los subproductos de estas especies como la fibra, carne, pieles y estiércol.

En la actualidad, la explotación de camélidos sudamericanos, se lleva a cabo bajo sistemas tradicionales no siempre eficaces, agudizando los problemas de morbilidad, mortalidad y baja eficiencia reproductiva (Cárdenas y col., 1999); donde los porcentajes de natalidad anual en la mayoría de explotaciones alpaqueras es del orden del 50% (Fernández, 1993), con índices de fertilidad (Apaza y col, 1998) y de preñez (Apaza y col., 2001) que no superan el 65% y 60% respectivamente. Con un reemplazo inadecuado para la reproducción, desconocimiento de la fisiología reproductiva y un inadecuado empleo de reproductores en el apareamiento (Apaza y col., 1998).

## **2.3. Anatomía reproductiva de la alpaca**

### **2.3.1. Órganos reproductores de la alpaca hembra**

#### **2.3.1.1. Ovarios**

La situación de los ovarios varía con la edad y estado reproductivo en el que la hembra se encuentra.

Los ovarios tienen una forma globular irregular, en alpacas, recién a los 12 meses de edad aparecen folículos de 8 a 12 mm de diámetro. En adultas vacías



usualmente se aprecian numerosos folículos de 3 a 4 mm y un folículo de entre 8 a 12 mm, que se proyecta casi totalmente sobre la superficie ovárica. Las dimensiones del ovario son de 15 mm de longitud x 12 mm de ancho x 9 mm de espesor. Los folículos que se encuentran entre 5 y 12 mm se consideran normales. En la alpaca la bursa ovárica envuelve totalmente al ovario (Fernández-Baca, 1991).

#### **2.3.1.2. Oviductos**

Son tubos delgados y sinuosos, suspendidos en el mesosálpinx, a la altura del istmo, el diámetro es de 2 a 3 mm (Fernández-Baca, 1991).

#### **2.3.1.3. Útero**

El útero es bifurcado con dos cuernos uterinos separados. Externamente desde el punto de bifurcación a la extremidad distal, terminan en una bolsa que circunda por completo el ovario (Fernández-Baca, 1991).

#### **2.3.1.4. Vagina y vulva**

La hendidura vulvar tiene una dirección ventro caudal, la comisura labial dorsal es ligeramente redondeada y se encuentra de 2 a 3 cm del orificio anal. La comisura labial ventral es aguda y termina en una corta proyección cónica (Fernández-Baca, 1991).

### **2.3.2. Órganos reproductores de la alpaca macho**

#### **2.3.2.1. Los testículos**

Los testículos en la alpaca se encuentran en la región perineal, aproximadamente a 10 cm del ano.

Los testículos están incluidos dentro de la bolsa testicular o escroto, que es un divertículo del abdomen que se forma por una modificación de la piel. Tiene la forma ovalada y está dividida por un tabique, en medio de las cavidades, las cuales están ocupadas por los testículos. El exterior del escroto es untuoso al

tacto por la presencia de secreciones sebáceas y está cubierto de abundantes pelos finos y presentan un surco sagital que es el rafe escrotal (Bustinza, 2001).

#### **2.3.2.2. El epidídimo**

Es un órgano fibroso compacto pegado al borde anterior del testículo. Anatómicamente se divide en tres partes: a) la cabeza tiene forma triangular y se sitúa en la parte ántero-inferior del testículo; b) el cuerpo es aplanado en forma de cinta que ocupa el dorso anterior del testículo; y, c) la cola tiene forma de una L, situada en la parte póstero-superior del testículo, aquí se acumulan y guardan los espermatozoides (Bustinza, 2001).

El conducto deferente es un conducto muy delgado que se origina en la cola del epidídimo, y es un órgano par, es delgado y largo. Se inicia con una estructura flexuosa craneomedial del epidídimo, asciende por el canal inguinal y se dirige hacia la cavidad pelviana, alcanzando el pliegue genital sufre un pequeño ensanchamiento, dorsal a la altura de la vejiga, lo que sería la ampolla del conducto deferente (Bustinza, 2001).

#### **2.3.2.3. Los órganos accesorios**

En la alpaca son: a) las glándulas seminales que son de tamaño medio y de forma irregular; b) la próstata de forma irregular y difusa (forma de H) ubicada dorsalmente sobre el cuello de la vejiga, el cuerpo prostático tiene dos lóbulos y la porción diseminada cuyo diámetro transversal tiene 4 cm y de 1 cm de grosor; y c) las glándulas bulbo uretrales que son ovoides y pequeñas a unos 7 cm de la próstata con 1 cm de diámetro. Todos estos producen una secreción que forma parte del eyaculado (Bustinza, 2001).

#### **2.3.2.4. Pene y prepucio**

El pene tiene la forma de una S denominada flexura sigmoidea que es ante escrotal diferente al toro que es pre escrotal; y tiene una longitud de 35-40 cm en erección y pesa aproximadamente 50 g. el diámetro es delgado y no se observa

expansión durante la erección. El glande tiene la forma de gancho curvo que presenta dos proyecciones o procesos uretrales, de aproximadamente 1 cm (Bustinza, 2001).

El forro prepucial es una invaginación de la piel que cubre el pene; en su abertura es de forma triangular y se suspende como una tela pendular, lo que hace que al miccionar la orina se dirija hacia atrás; pero durante la erección se proyecta hacia delante (Bustinza, 2001).

## **2.4. Pubertad de la alpaca**

Las alpacas hembras jóvenes de 12 a 13 meses de edad muestran conducta de estro similar a las adultas aún cuando la actividad ovárica empieza a los 10 meses con la presencia de folículos de 5 mm o más.

En un estudio realizado en el Perú con alpacas hembras de un año de edad, se determinó que había una relación muy significativa entre el peso corporal en el apareamiento y las tasas de nacimiento subsecuentes. Por cada kilogramo más de peso se incrementa 5% de natalidad, pero cuando el peso corporal excede los 33 kilogramos, el porcentaje de hembras preñadas era independiente al peso corporal.

En los sistemas tradicionales de producción, 50% o menos de las alpacas de un año de edad alcanzan un peso de 33 kilogramos de peso corporal en el momento del apareamiento; por lo tanto, la edad de reproducción se pospone hasta los dos años de edad en alpacas. (Citado por Hafez y col., 2002).

## **2.5. Fisiología reproductiva de la alpaca**

### **2.5.1. Desarrollo folicular**

Cuando no se exponen a un macho, las alpacas hembras muestran periodos de receptividad sexual prolongados, y periodos breves de rechazo del macho que pueden durar 48h, y que pueden correlacionarse con incrementos y

decrementos rítmicos de las contracciones séricas de estrógenos, lo que refleja ondas sucesivas de maduración y atresia de los folículos ováricos.

Con base en exámenes laparoscópicos de los ovarios de las alpacas, se observó que el crecimiento, la conservación y la regresión de un folículo requirieron cada uno un promedio de cuatro días (12 días en total; con límites de 9 a 17 días). Las llamas que permanecieron en su hábitat natural del Perú se examinaron todos los días mediante ultrasonografía transrectal. Folículos dominantes sucesivos surgieron a intervalos de  $19.8 \pm 0.7$  días en llamas sin apareamiento o apareadas con machos vasectomizados y de  $14.8 \pm 0.6$  días en llamas preñadas. La lactación se vinculó con un intervalo entre ondas que se acortó  $2.5 \pm 0.05$  días en comparación con un grupo que no estaba en lactación (citado por Hafez y col., 2002).

La variabilidad tanto en la duración de la receptividad sexual como en la regularidad con la que ocurre, parece reflejar el hecho de que en hembras no preñadas la fase folicular no concluye con la ovulación en un momento predeterminado, y que no hay una fase lútea que delimita la sincronización de los acontecimientos ováricos después del fin del estro (citado por Hafez y col., 2002).

### **2.5.2. Ovulación**

El proceso de la ovulación en las alpacas no ocurre espontáneamente; sino que se produce sólo cuando es inducida, aunque parece existir muy raras excepciones. La función ovulatoria de ambos ovarios, izquierdo y derecho, son iguales, y aún más, alrededor de un 10% de los casos ocurren en forma múltiple, de los cuales la mayoría son dobles (Bustinza, 2001).

Entre 20 y 24 h después del coito se observa claramente el crecimiento folicular pre-ovulatorio con paredes de vascularización aumentada y acercándose a las 26 h, en la superficie folicular, presentan hemorragias

puntiformes. Y a partir de las 26 h, en condiciones naturales, se produce la rotura folicular, con la consiguiente ovulación. En realidad la ovulación ocurre entre 24 a 42 h después de la cópula; y más tarde un 30%; y en el 10% restante no se produce ovulación, después de una cópula simple (Bustinza, 2001).

Normalmente la ovulación es inducida por el coito, la cual debe proporcionar un estímulo nervioso necesario a nivel de la vagina. Para que se produzca la ovulación, la estimulación neural llega al hipotálamo causando la liberación de la GnRH, la que a su vez, causa en la pituitaria la liberación de la LH, la que es capaz de causar la ruptura folicular y la consiguiente liberación del óvulo (Bustinza, 2001).

Se ha determinado que el macho, para desencadenar el mecanismo ovulatorio de la hembra, debe realizar el estímulo necesario a través de la introducción del pene en la vagina y apretones con las extremidades anteriores del macho. Sin embargo, las hembras montadas por machos con mandil o vasectomizados responden con el inicio de la ovulación. En el caso de las hembras que montan a otras hembras, también pueden desencadenar la ovulación tanto de ella como de la que se deja montar. Por otro lado, la sola presencia y/o ruidos guturales de los machos pueden producir la ovulación. Y finalmente, ha sido reportado ovulación espontánea hasta en un 5% (Bustinza, 2001).

En la alpaca el tiempo mínimo de ovulación se calculó en 26 h después del apareamiento natural y 24 h después del tratamiento con hCG. En alpacas hembras receptoras a las que se les permitió un solo apareamiento, 50% ovuló en un lapso de 26 y 30 h, 24% ovuló entre 30 a 72 h después y 26% no ovuló después del apareamiento. Cerca del 40% de las hembras que no ovularon tenían un año y el 15% eran adultas. Con el empleo de la técnica de ultrasonografía en las llamas, se observó que la ovulación ocurre, en promedio,

dos días (con límites de uno a tres días) después de un solo apareamiento. Un solo servicio por un macho intacto o vasectomizado provocó la ovulación en 77 a 82% de alpacas, y un incremento a tres del número de servicios por machos intactos en un periodo de 24 h no influyó de manera significativa en la tasa de ovulación (citado por Hafez y col., 2002).

### **2.5.3. Cuerpo lúteo**

El cuerpo lúteo aparece como resultado de la ovulación y se puede detectar por palpación o ultrasonografía. Si en la fertilización no se produce el cuerpo lúteo inicia su regresión aproximadamente a los 10 u 11 días, provocado por las prostaglandinas, regresiona el cuerpo lúteo. Concentraciones de progesterona en sangre y pregnadiol en orina reflejan la existencia de un cuerpo funcional (Bustinza, 2001).

La concentración de progesterona igual o mayor que 1 mg/ml a 7 días de la cópula indica ovulación y actividad luteal, pero no necesariamente preñez; la misma cantidad de ella a los 21 días es indicación de preñez. La progesterona es necesaria para el mantenimiento de la preñez por todo el periodo de la gestación, y la eliminación del cuerpo lúteo o del ovario que lo contiene termina con la gestación (Bustinza, 2001).

### **2.5.4. Gestación**

Se ha citado que la gestación en alpacas de raza huacaya y suri dura de 341 a 345 días, respectivamente. Casi todos los fetos de alpacas y llamas ocupan el cuerno uterino izquierdo, incluso cuando la ovulación ocurre en ambos ovarios con igual frecuencia. Esto indica que los embriones que se originan en el lado derecho migran al cuerno izquierdo para implantarse. No se conoce bien la razón la de la migración del lado derecho al izquierdo pero parece ser exclusivo de los camélidos. Una explicación de este fenómeno comprende un efecto luteólico diferencial del cuerno izquierdo frente al derecho. El cuerno derecho

realiza una luteólisis mediante una vía local, en tanto que el izquierdo lo realiza por ambas vías la sistémica y la local (citado por Hafez y col., 2002).

#### **2.5.6. Parto**

El trabajo de parto sin ayuda en alpacas a 4 250 msnm en Perú duró un promedio de 203 minutos en el caso de hembras primíparas y 193 minutos en hembras múltiparas. Más del 90% de los nacimientos en alpacas y llamas ocurren entre las 07:00 y las 13:00 horas. Esta adaptación da a las crías la mejor oportunidad de calentarse y secarse antes del frío nocturno (citado por Hafez y col., 2002).

#### **2.6. Obtención de ovocitos**

Los ovocitos pueden ser obtenidos de ovarios traídos desde el matadero o de la castración de hembras, siendo la primera técnica la más común y económica para trabajos experimentales (Palma, 2001). Otra forma de obtención de ovocitos es de animales vivos, a través de la punción folicular u “ovum pick up” (OPU); técnica que fue originalmente creada para ser usada en humanos y que luego se modificó para ser usada en vacas (Pieterse y col., 1987). Los ovocitos se pueden obtener también a través de una laparotomía y aspiración directa desde los ovarios del animal anestesiado, técnica utilizada en primates inferiores (Marshall y col., 1998 y Mitalipov y col., 2001).

Cuando los ovarios son obtenidos post-faenamiento de las hembras, son transportadas desde el matadero, en Solución Salina Fisiológica o Solución Fosfato Buffer Salino (PBS) con o sin la adición de antibióticos (Palma, 2001) a temperaturas variables entre 28 y 38°C (Fuladi y col., 1998); sin embargo se llegó a la conclusión de que el transporte de ovarios a 4°C, hasta por 24 horas, no altera la viabilidad de ovocitos obtenidos.

Para la recolección de ovocitos el método más utilizado, es la aspiración de los complejos cúmulo-ovocito desde los folículos, utilizando agujas de 21 a 18 g

y jeringas o bombas de aspiración (Palma, 2001), otros métodos son la disección del ovario o su desintegración enzimática, utilizando colagenasa para aislar los folículos y obtener los ovocitos directamente de ellos (Gordon, 1994).

Los folículos, de los cuales se extraen los ovocitos se prefieren de un tamaño no inferior a los 2 mm de diámetro (Loneragan y col., 2005), concluyeron que los ovocitos obtenidos de folículos cuyo diámetro era inferior a 2 mm, luego de la fertilización *in vitro* mostraban tasas significativamente inferiores de división y blastocistos al ser comparadas en ovocitos fertilizados *in vitro*, provenientes de folículos de tamaño superior.

## **2.7. Recuperación de complejos cúmulo-ovocito**

Distintas metodologías se han evaluado para la recuperación de COCs (complejos cúmulo-ovocito) en hembras de camélidos sudamericanos. Ovarios de alpacas y llamas beneficiadas son una fuente adecuada para la recuperación de COCs, por la gran disponibilidad de ovocitos para la investigación en la estandarización de protocolos de maduración y fecundación *in vitro*, y para su utilización como receptores de núcleo de células donadoras en un programa de transferencia nuclear. La primera recuperación de ovocitos para su fecundación *in vitro* en camélidos sudamericanos se hizo en llama desmenuzando el ovario con ayuda de una hoja de afeitar (Del Campo y col., 1994) se recuperó 27 ovocitos por llama y fue descartado el 26% de los 1324 COCs (complejos cúmulo-ovocito) recuperados. También se han recuperado COCs de llama y alpaca puncionando folículos de ovarios recuperados en el camal con ayuda de una jeringa manual. Con esta metodología (Del Campo y col., 1992), recuperaron 6,4 ovocitos por llama (Ruiz y col., 2007), utilizando ovarios procedentes del Camal Municipal de Huancavelica aspiraron folículos con agujas 21 G y jeringas estériles de 5 cc en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Universidad Nacional de Huancavelica. Se recuperaron 2,2 COCs/ovario de



llama y 3,5 COCs/ovario de alpaca con 66% y 69% COCs de llama y alpaca, respectivamente, seleccionados como aptos para la maduración *in vitro*, metodología de trabajo aplicada por primera vez en el Perú para la maduración de ovocitos y producción *in vitro* de embriones en camélidos sudamericanos.

## **2.8. Selección de ovocitos para maduración**

Los ovocitos son seleccionados bajo una lupa estereoscópica con aumento de 40x en base a sus características morfológicas Palma (2001), sugiere que se deben cultivar sólo los ovocitos que posean un cúmulo denso, con un mínimo de 5 capas que cubran la totalidad de la superficie del ovocito, que su citoplasma sea de color gris oscuro uniforme y no contenga manchas.

De Losse y col. (1989), han sugerido un sistema de clasificación en escala, a partir de los criterios antes mencionados, para clasificar los ovocitos según su calidad. Así de categoría 1 se consideran los complejos cúmulo-ovocito (COCs) con cúmulos de capas múltiples, compacto, claro y transparente y citoplasma con granulación fina y homogéneas; categoría 2 son los del COCs cúmulos algo más oscuros y menos transparentes que los de la categoría 1, con citoplasma de granulación más gruesa y más oscura que los de la categoría 1, los de la categoría 3 poseen cúmulo menos compactos y más oscuro que los de la categoría 1 ó 2 y su citoplasma tiene manchas oscuras; la categoría 4 incluye a los ovocitos con cúmulo expandido parcialmente desnudos o totalmente desnudos.

Según los mismos autores, ovocitos de mala calidad serían aquellos de tamaño muy grande o muy pequeños, los que presentan menos de 3 capas de células del cúmulo o aquellos donde el cúmulo no está compacto o es de coloración muy oscura. El citoplasma de los ovocitos de mala calidad puede presentar un color no uniforme teniendo zonas muy claras o muy oscuras o ser

de color uniforme pero muy claro o muy oscuro. Ovocitos de mala calidad derivan de folículos en atresia.

Loneragan y col., (1994) demostró la relación entre la morfología ovocitaria y el tamaño del folículo del cual proviene en su estudio comparó características morfológicas de los ovocitos, tales como presencia y número de capas de cúmulo. Concluyó que ovocitos de calidad significativamente inferior (menor número de capas de cúmulos) son obtenidos de folículos de tamaño entre 2 y 6 mm, al compararlos con ovocitos provenientes de folículos de tamaño superior a 6mm.

## **2.9. Maduración *in vitro* de ovocitos (MIV)**

En el ovocito de la mayoría de mamíferos, la meiosis se inicia durante la vida fetal pero se detiene en el diploteno de la profase de la primera división meiótica, lo que ocurre cercano al nacimiento, (Palma, 2001). La maduración ocurre *in vivo* al interior del folículo y es el proceso durante el cual se produce la reactivación de la división meiótica hasta alcanzar la metafase de la segunda división meiótica momento en que el ovocito retorna al arresto meiótico hasta que sea fecundado o activado artificialmente (Rath, 2001).

La primera modificación visible del núcleo, después del cultivo para la maduración, es la desaparición del nucléolo, condensación de la cromatina y la disolución de la membrana nuclear, proceso conocido como ruptura de la vesícula germinativa, una vez ocurrido esto la actividad meiótica progresa a través de la metafase I a anafase, telofase, con expulsión del primer corpúsculo polar y detenimiento en el estadio de metafase II (Palma, 2001). La meiosis se reinicia sólo una vez que el ovocito es penetrado por el espermatozoides o es activado artificialmente, la finalización de la segunda división meiótica es acompañada por la extracción de un segundo corpúsculo polar en el espacio

perivitelino, en esta etapa el ovocito cuenta con un número haploide de cromosomas (Gordon, 1994).

*In vivo* la maduración nuclear del ovocito de alpaca, tarda unas 24 h, es un periodo largo de tiempo si se compara con otras especies animales como la rata y la coneja, esto se debe a que los ovocitos totalmente desarrollados de rata y coneja poseen todas las proteínas esenciales para la condensación de la cromatina y la disolución de la envoltura nuclear. Mientras que los de ovocitos de vaca, alpaca, cerda y ovejas están equipados sólo para la condensación de la cromatina, antes del reinicio de la meiosis (Gordon, 1994).

## **2.10. Factores importantes para la maduración *in vitro* de ovocitos**

Para que la maduración *in vitro* sea exitosa, el medio en la cual se realizará debe proveer condiciones óptimas para los complejos cúmulo. Entre estos factores se cuentan con pH, atmósfera gaseosa en la incubadora de cultivo, osmolaridad, uso de suplementos proteicos y hormonas.

### **2.10.1. pH y ambiente gaseoso**

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). Otro buffer suplementado al medio de cultivo es el 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetansulfónico (HEPES). Se utiliza en concentraciones entre 10 y 50 mM, en un rango de pH entre el 7,2 – 7,8 es un buffer más fuerte que el bicarbonato y no requiere de CO<sub>2</sub> por lo que su función es regulador de pH es más efectiva fuera de la incubadora de cultivo (Freshney, 1987).

La concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera de la incubadora de cultivo, puede alterar el pH del medio de maduración: a menos contenido de CO<sub>2</sub> en el ambiente, el medio se irá haciendo más alcalino y el color del medio de maduración se irá haciendo más violeta, por lo contrario, si el medio se

acidificará su color acercándose al amarillo, para un efectivo control visual de las variaciones de pH, se emplea el rojo fenol adicionado a los medios de cultivo (Palma, 2001).

#### **2.10.2. La Osmolaridad**

Debe variar entre 275 y 285 miliosmoles (mosm), niveles que son ligeramente inferiores a los del plasma (290 mosm aproximadamente). Sin embargo esta condición hipotónica del medio es para compensar la evaporación durante la incubación (Freshney, 1987).

#### **2.10.3. Proteínas**

El suero junto con la albúmina bovina, es el complemento orgánico más importante de los medios. En su preparación se utiliza albúmina de suero bovino o suero fetal. La albúmina sérica bovina fracción V es la más utilizada por la ventaja de su presentación en polvo. El suero más empleado para su preparación de medios de maduración es el suero fetal bovino en concentraciones de 2% al 10% (Palma, 2001).

La ventaja del uso de sueros en el medio de maduración, es que estos aportan, nutrientes vitaminas, factores de crecimiento, hormonas y compuestos antioxidantes en concentraciones variables (Hoshi, 2003).

Aunque existen cultivos celulares que requieren suero, existe evidencias suficientes, que los ovocitos pueden ser madurados sin la presencia de suero en el medio (Hoshi, 2003).

#### **2.10.4. 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). Las gonadotropinas aumentan la capacidad de desarrollo de ovocitos maduros en medios libres de suero (Saeki y col., 1995).

### **2.11. Fecundación *in vitro***

La fecundación *in vitro* (FIV) es el procedimiento por medio del cual los ovocitos maduros son cultivados junto con espermatozoides y de esta forma 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). La utilización de la fecundación *in vitro* en camélidos sudamericanos podría ser una alternativa para el mejoramiento genético de camélidos domésticos y para la preservación de los camélidos silvestres.

### **2.12. Vagina artificial**

Esta técnica fue desarrollada por Sumar y Leyva (1981), para lo cual construyeron un maniquí en forma de una hembra sentada en posición de cópula; la vagina artificial fue una modificación de la vagina artificial usada para vacunos y ovinos, la cual consistía en un tubo rígido de 7 cm de diámetro por 25 cm. de largo con una funda interna de látex, un cono de látex al que envolvía un alambre en espiral simulando la cervix de la alpaca y al final un frasco de colección de semen de ovino o un tubo de centrifuga, el agua a 45° se coloca por una válvula-espita; los machos aceptaron el maniquí después de un corto entrenamiento; la cópula se interrumpía cada 10 minutos aproximadamente para renovar el agua caliente, el semen colectado varió, dependiendo del macho, el color del eyaculado, independientemente del volumen, fue de un blanco lechoso a blanco claro, este semen no muestra motilidad masal por lo espeso de su consistencia.

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

### **2.13. Selección de espermatozoides**

Un proceso de FIV implica someter los espermatozoides a un procedimiento de lavado y selección en donde los espermatozoides de mayor movilidad son separados de los inmóviles o muertos, del plasma seminal y de otras estructuras por medio de técnicas como el Swim-up y la Gradiente de Percoll. Ambas requieren como mínimo un paso de centrifugación, en el cual se puede generar daño a la membrana plasmática de los gametos masculinos y aumentar la producción de radicales libres. Una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) conduce a la pérdida de la funcionalidad y viabilidad espermática, correlacionadas con los efectos deletéreos causados por la peroxidación lipídica y la fragmentación del ADN (Lonergan y col., 1994).

En animales una serie de estudios muestran que la viabilidad embrionaria es dependiente de la calidad del espermatozoide, lo cual indica la necesidad de ser prudentes en el manejo de los reproductores así como en la manipulación del semen en el laboratorio a fin de no alterar drásticamente su capacidad de fecundar y de llevar a feliz término el desarrollo embrionario bovino (Lonergan y col., 1994).

### **2.14. Capacitación de espermatozoides**

La capacitación fisiológica de los espermatozoides empieza después de entrar en contacto con el tracto reproductivo de la hembra. Mientras el espermatozoide está en el sistema reproductor masculino, la capacitación está inhibida por sustancias presentes en el plasma seminal. Por eso los métodos descritos a continuación, lo que hacen es eliminar el plasma seminal y de ese modo eliminar las sustancias inhibitoras de la capacitación y permitir la colocación de unos espermatozoides capacitados en el interior del útero o en una placa de Petri al lado del óvulo, para la fecundación *in vitro*. Una vez iniciada la capacitación, se pone en marcha el mecanismo de la reacción del acrosoma

que ocurre cuando el espermatozoide llega a la corona radiada (Conde y col., 2006).

La zona pelúcida es la barrera que impide la fecundación del ovocito por espermatozoides de otras especies. El espermatozoide se une y se mueve oblicuamente en la zona ayudado por las enzimas (acrosina), liberadas tanto por el acrosoma como por el oviducto y por la presencia de sustancias de reconocimiento de especie. Aunque se elimine la zona pelúcida, el espermatozoide debe pasar por el proceso de la reacción del acrosoma para que ocurra la fertilización del ovocito (Conde y col., 2006).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ubicación**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental agraria Canaán – INIA Ayacucho ubicado a 2760 m.s.n.m.

Las muestras de ovarios se recolectaron del Camal Municipal de Pilpichaca por lo que se tuvo que viajar al distrito de Pilpichaca, provincia de Huaytará, departamento de Huancavelica ubicado a 4000 m.s.n.m.

#### **3.2. Población y muestra**

La población fue conformada por todas las alpacas beneficiadas del Camal Municipal de Pilpichaca.

La muestra se tomó a 100 alpacas de manera no probabilística por las características de las mismas, para cuyo efecto, se considerará los criterios: oportunidad y cantidad de beneficios. Como unidad de muestra se tomó 200 ovarios de alpaca beneficiados del Camal Municipal de Pilpichaca.

#### **3.3. Recolección y transporte de ovarios de alpaca *post mortem***

Los ovarios utilizados procedieron de alpacas sacrificadas en el Camal Municipal de Pilpichaca - Huancavelica. Tras su recogida se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria



Canaán, en Solución Fisiológica, con penicilina (100 UI/ml) y sulfato de estreptomicina (100 mg/ml) a una temperatura promedio de 37 °C. A su llegada al laboratorio, los ovarios fueron lavados dos veces con agua destilada y una en solución salina fisiológica con antibióticos y se mantuvo en suero salino estéril a 37 °C con las mismas cantidades de antibióticos de su recogida hasta el momento de la aspiración.

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

Los Complejos cúmulo-ovocito (COCs) de ovarios de alpacas fueron recuperados con una aguja de 21 G y una jeringa de 5 ml. El procedimiento se realizó aproximadamente dentro de las 5 h siguientes al sacrificio de los animales. El líquido folicular con los COCs recuperados fue depositado en un tubo graduado de 15 cc que reposó en baño María a 37° C. Luego el contenido se vació en una placa de Petri para ser diluido en solución de HEPES; ésta placa previamente fue señalizada para facilitar la búsqueda de los COCs. La selección de los COCs (TABLAN° 01) se realizó con una jeringa Hamilton de 100 µl bajo una lupa estereoscópica, solamente los COCs de categoría 1 y 2 fueron madurados *in vitro*.

#### **3.5. Maduración *in vitro* de ovocitos (MIV)**

Los complejos cúmulo-ovocito (COCs) de alpacas fueron seleccionados y lavados 3 veces en medio de maduración (TCM -199 modificado con HEPES) compuesto por sales de Earles y FSH + LH (Sigma) 0,02 unidades/ml, 0.2 mM de piruvato de sodio, estradiol 17-β (sigma) 1µg/ml y suero fetal bovino al 10%. La MIV se realizó en placas de 4 pocillos en grupos de 50 CCOs (máximo) por 500 µl de medio. Los COCs fueron cultivados a 38,5 °C por un lapso de 24, 26, 48, 72 h, con 5% de CO<sub>2</sub> y 96% de humedad.

**TABLAN° 01: CLASIFICACIÓN DE COMPLEJOS CÚMULO-OVOCITO (COCs)  
DE ALPACAS**

<b>Categorías</b>	<b>Características por Categoría</b>
1	COCs con cúmulos de capas múltiples (>5 capas), compacto, claro y transparente y citoplasma con granulación fina y homogénea.
2	COCs parcialmente rodeados por células del cúmulo (entre 2-5 capas), con cúmulos algo más oscuros y menos transparentes y con citoplasma de granulación más gruesa y más oscura que en la categoría 1.
3	COCs con cúmulo menos compacto y más oscuro que en la categoría 1 ó 2 y citoplasma con manchas oscuras.
4	Incluye a los ovocitos con cúmulo expandido, parcialmente desnudos o totalmente desnudos.

Fuente: De Loose y col., (1989).

### **3.6. Método de recuperación de espermatozoides**

Para la colección de semen se tuvo que elaborar una vagina artificial para lo cual se utilizó un tubo de PVC de 20 cm de largo y 6 cm de diámetro donde se colocó por dentro dos fundas de látex, una funda recta y una funda cónica a la que se le colocó en uno de sus extremos un tubo graduado de 15 cc para recoger el semen colectado. Para la colección de semen se tuvo que colocar agua a 37 °C dentro del tubo esto para asemejar a la vagina de una alpaca hembra. Luego de tener lista la vagina artificial se procedió a realizar la colecta de semen, se utilizó una alpaca hembra vacía para que sirva como maniquí y una vez que se encontraron en posición de cópula se procedió a coger el pene de la alpaca macho, desviarlo e introducirlo en la vagina artificial hasta que este eyacule, durante un promedio de 10 a 15 minutos. Una vez obtenido el semen fue trasladado al laboratorio para realizar los lavados y la capacitación respectiva.

### **3.7. Lavado de espermatozoides**

#### **3.7.1. Método de separación por Swim up**

- Se colocó en tubos de centrifugación de 15 cc, 2 ml de semen con 2 ml de medio de cultivo Sp-Talp
- Se centrifugó a 1800 rpm por 5 m, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 2 ml de medio de cultivo Fert-Talp.
- Se centrifugó a 1800 rpm por 5 m, paralelamente en un tubo Eppendorf se colocó 1 ml del medio de cultivo Fert-Talp y se llevó a la incubadora de CO<sub>2</sub>. Luego de la centrifugación se descartó el sobrenadante y al pellet se agregó 100 µl de medio Fert-Talp y se homogenizó, luego con una micropipeta se tomó todo el pellet diluido y lentamente se agregó al fondo del tubo Eppendorf que contenía 1ml de cultivo Fert-Talp, sin que se produzca la disociación del pellet.

- Se colocó en la incubadora de CO<sub>2</sub> a 38°C con una inclinación del tubo en 45° y se dejó migrar los espermatozoides por 30 a 60 min.
- Se tomó 10 µl del sobrenadante, se colocó en una Cámara de Newbauer y se procedió a determinar la concentración de espermatozoides.
- Se realizó la inseminación de acuerdo a la concentración de espermatozoides.

### 3.8. Cultivo de embriones

Pasadas las 18 h de post inseminación *in vitro*, se retiraron las células de la granulosa y los detritos celulares con una micropipeta en Medio Fert-Talp. Los ovocitos libres de cúmulus se lavaron en Medio Fert-Talp y en SOF-IVC 2 veces en cada uno y se cultivaron en gotas de 50 µl de SOF-IVC durante 8 días a 38.5 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y 96% de humedad.

### 3.9. Evaluación de la tasa de desarrollo

La segmentación fue evaluada a las 48 horas post-inseminación *in vitro* y la tasa de mórulas y blastocistos a los 8 días.

### 3.10. Técnicas de procesamiento y análisis estadístico de datos

Todos los experimentos fueron repetidos 7 veces. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos se compararon utilizando el análisis de varianza (ANOVA). También se utilizó la prueba de Duncan para contrastar la diferencia entre promedios. El modelo estadístico utilizado para describir una observación fue:

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

Los componentes del modelo son:

$Y_{ij}$  = observaciones (tasa de segmentación y de blastocistos).

$\mu$  = media general.

$T_i$  = efecto de los tratamientos

$e_{ij}$  = error asociado a cada observación.

## **IV. RESULTADOS**

**TABLA N° 02: N° DE OVOCITOS MADURADOS Y OVOCITOS EN DIVISIÓN DE *Lama pacos* "alpaca" DESPUÉS DE 24 HORAS.**

N° Ovarios	N° Ovocitos	N° Ovocitos madurados	Ovocitos en División 2	Ovocitos en División 4	Mórula	Blastocisto
6	30	25	4	3	2	0
6	33	28	5	2	0	0
7	58	46	9	7	2	0
7	28	18	5	4	1	0
6	26	19	4	2	0	0
5	32	26	5	5	2	0
8	36	30	5	4	3	0
<b>TOTAL</b>						
45	243	192	37	27	10	0

**TABLA N° 03: N° DE OVOCITOS MADURADOS Y OVOCITOS EN DIVISIÓN DE *Lama pacos* "alpaca" DESPUÉS DE 26 HORAS.**

<b>N° Ovarios</b>	<b>N° Ovocitos</b>	<b>N° Ovocitos madurados</b>	<b>Ovocitos en División 2</b>	<b>Ovocitos en División 4</b>	<b>Mórula</b>	<b>Blastocisto</b>
8	35	28	6	6	2	0
9	35	29	6	6	4	0
6	20	16	4	2	1	0
8	31	24	7	6	3	0
10	42	32	6	6	2	0
10	48	39	8	7	3	0
7	30	24	5	5	4	0
<b>TOTAL</b>						
58	241	192	42	38	19	0

**TABLA N° 04: N° DE OVOCITOS MADURADOS Y OVOCITOS EN DIVISIÓN DE *Lama pacos* "alpaca" DESPUÉS DE 48 HORAS.**

<b>N° Ovarios</b>	<b>N° Ovocitos</b>	<b>N° Ovocitos madurados</b>	<b>Ovocitos en División 2</b>	<b>Ovocitos en División 4</b>	<b>Mórula</b>	<b>Blastocisto</b>
8	19	16	0	0	0	0
8	41	29	1	0	0	0
6	30	22	0	0	0	0
10	58	43	2	1	0	0
8	38	31	0	0	0	0
6	25	18	0	0	0	0
6	24	16	1	0	0	0
<b>TOTAL</b>						
52	211	175	4	1	0	0



**TABLA N° 05: N° DE OVOCITOS MADURADOS Y OVOCITOS EN DIVISIÓN DE *Lama pacos* "alpaca" DESPUÉS DE 72 HORAS.**

N° Ovarios	N° Ovocitos	N° Ovocitos madurados	Ovocitos en División 2	Ovocitos en División 4	Mórula	Blastocisto
6	27	20	0	0	0	0
8	40	32	1	0	0	0
6	25	19	0	0	0	0
7	32	25	0	0	0	0
6	28	21	0	0	0	0
8	32	26	0	0	0	0
7	30	23	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>						
48	214	166	1	0	0	0

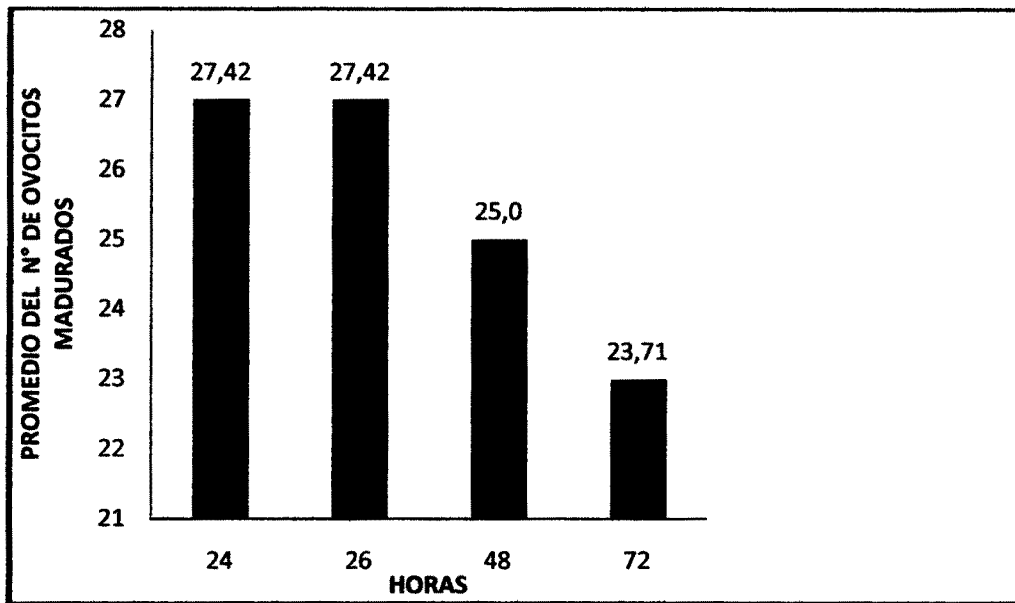
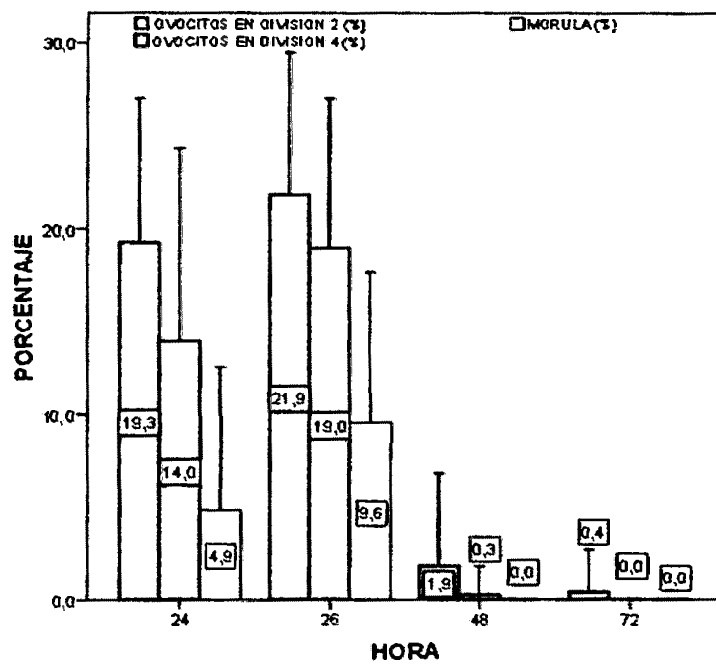


Figura N° 01: Valores promedio de ovocitos madurados *in vitro* de *Lama pacos* "alpaca" en relación al tiempo.

**TABLAN° 06: TASA DE SEGMENTACIÓN DE OVOCITOS DE *Lama pacos* "alpaca" A DIFERENTES TIEMPOS.**

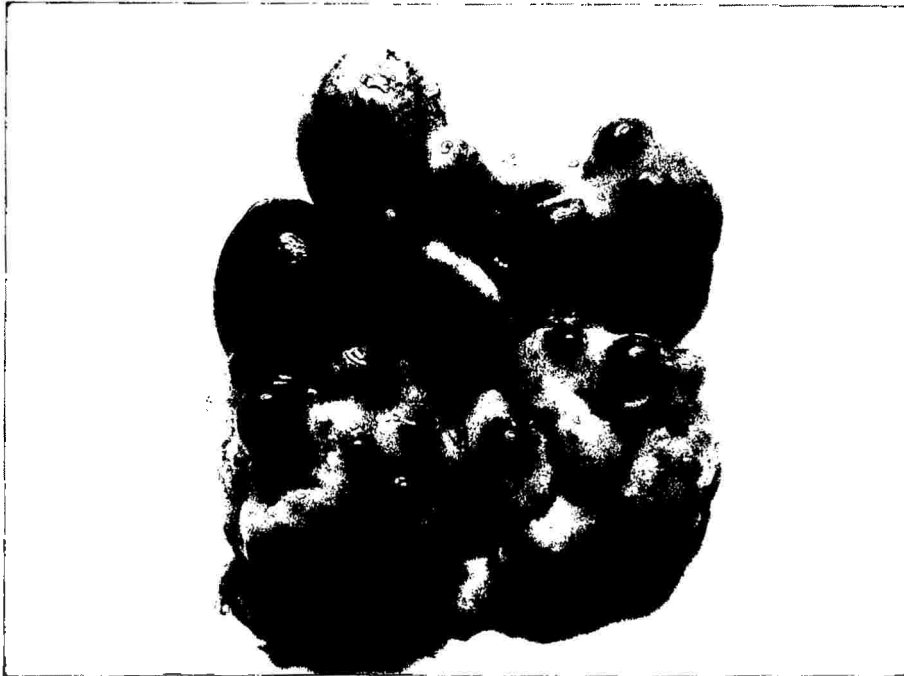
HORAS	OVOCITOS MADUROS (N°)			OVOCITOS EN DIVISIÓN 2 (%)			OVOCITOS EN DIVISIÓN 4 (%)			MÓRULA(%)		
	N	Media	Desv. típ.	N	Media	Desv. típ.	N	Media	Desv. típ.	N	Media	Desv. típ.
24	7	27.43	9.31	7	19.28	3.86	7	14.00	5.16	7	4.86	3.85
26	7	27.43	7.21	7	21.86	3.80	7	19.00	4.00	7	9.57	4.03
48	7	25.00	9.97	7	1.86	2.48	7	0.28	0.76	7	0.00	0.00
72	7	23.71	4.46	7	0.43	1.13	7	0.00	0.00	7	0.00	0.00



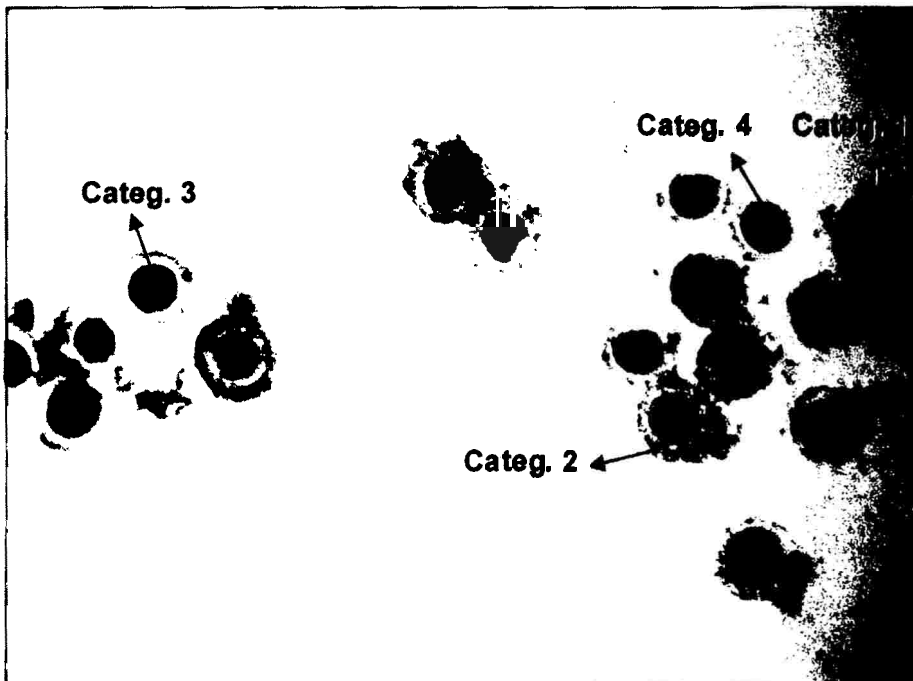
**Figura N° 02:** Porcentaje de la tasa de segmentación de ovocitos de *Lama pacos* "alpaca" según estadio a diferentes tiempos.

**TABLAN° 07: TASA DE SEGMENTACIÓN PROMEDIO DE OVOCITOS DE**  
*Lama pacos* "alpaca" EN CONDICIONES *in vitro*.

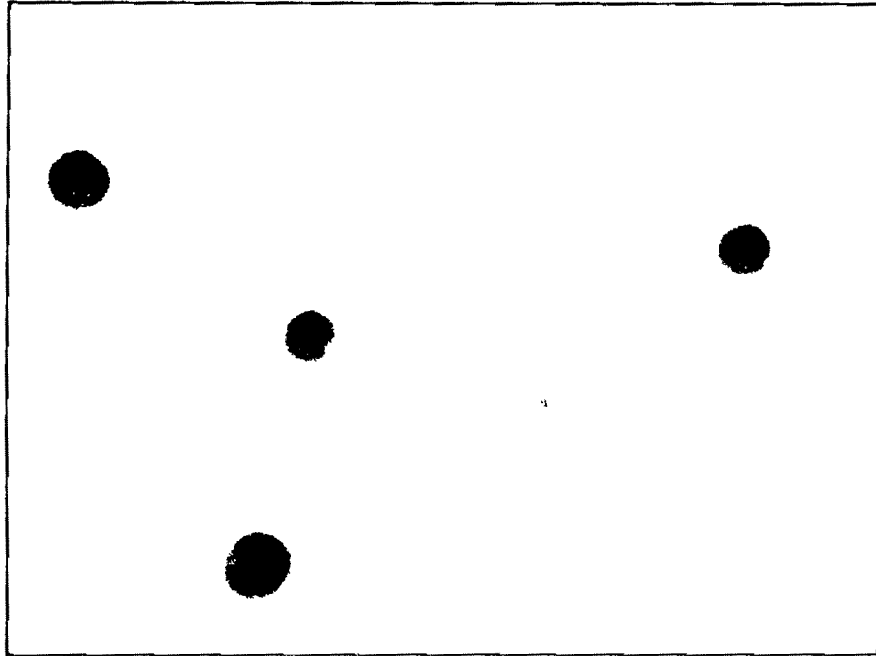
<b>HORA</b>	<b>N° REPETICIONES</b>	<b>OVOCITOS MADURADOS (N°)</b>	<b>OVOCITOS EN DIVISIÓN 2 (%)</b>	<b>OVOCITOS EN DIVISIÓN 4 (%)</b>	<b>MÓRULA (%)</b>	<b>BLASTOCISTO (%)</b>
24	7	192	19.28	14.00	4.86	0.00
26	7	192	21.86	19.00	9.57	0.00
48	7	175	1.86	0.28	0.00	0.00
72	7	166	0.43	0.00	0.00	0.00



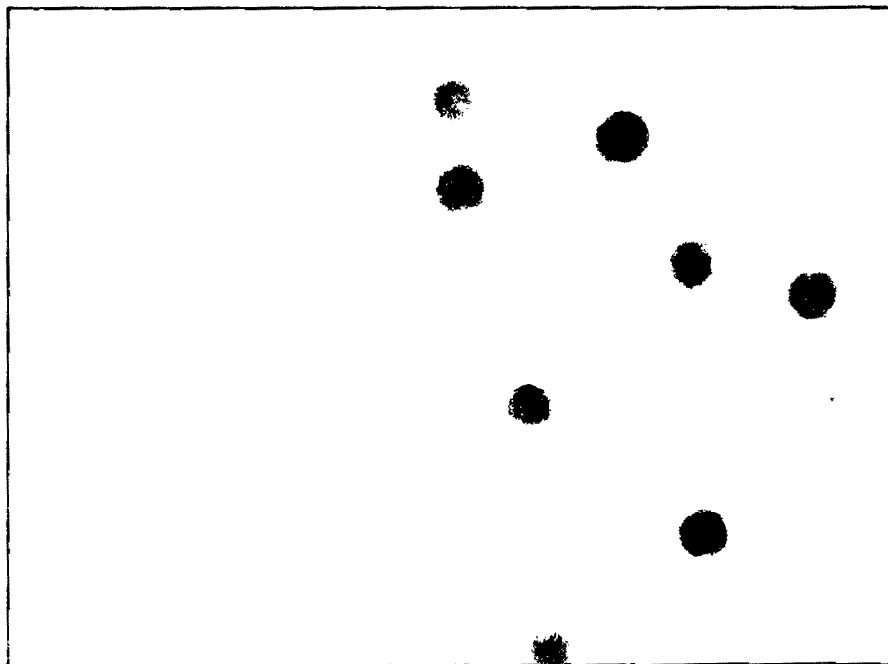
**Fotografía N° 01:** Ovarios de alpaca obtenidos de camal.



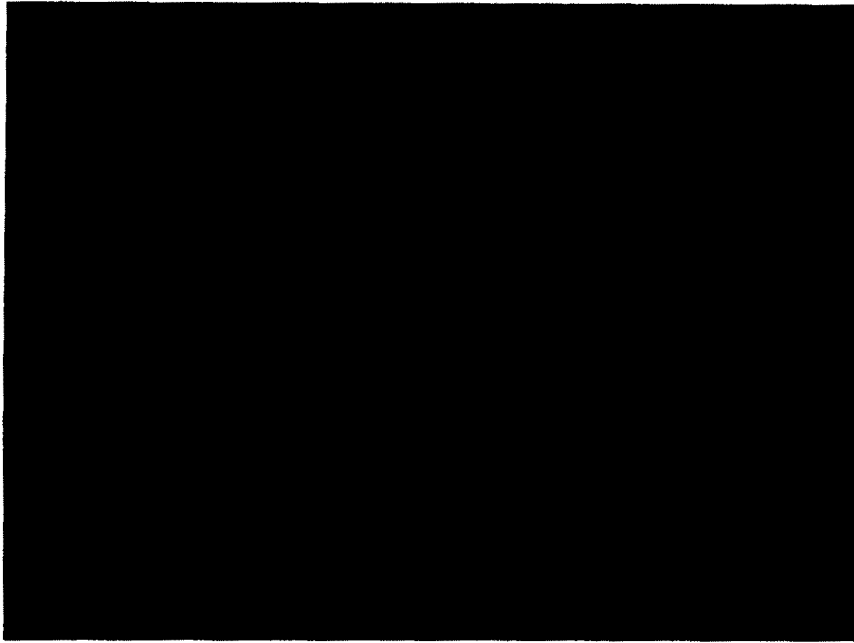
**Fotografía N° 02:** Ovocitos de alpaca luego de la aspiración folicular observados en un estereoscopio a un aumento de 10X.



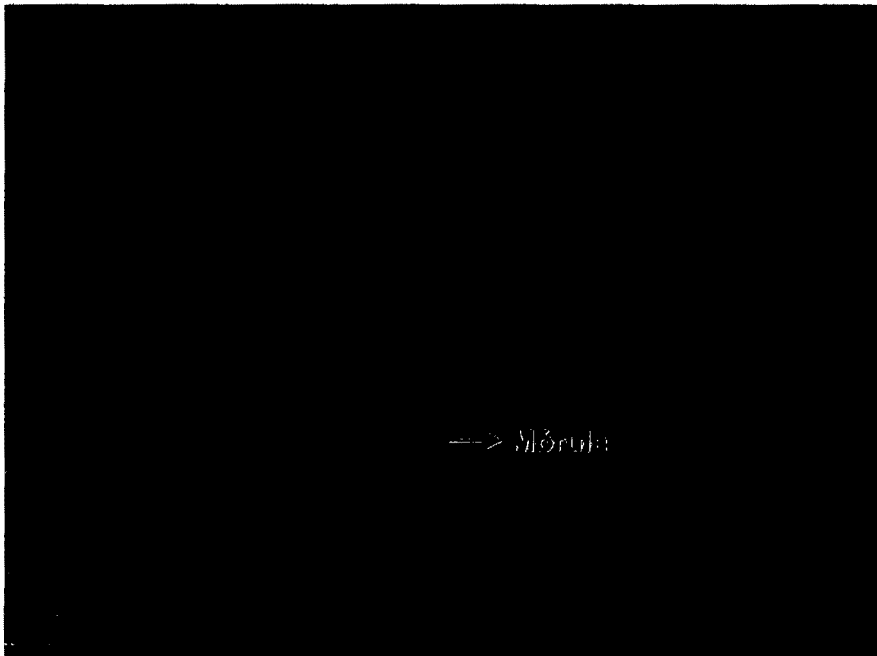
**Fotografía N° 03: Ovocitos en división 2 observados a un aumento de 10X.**



**Fotografía N° 03: Ovocitos en división 2 observados a un aumento de 10X.**

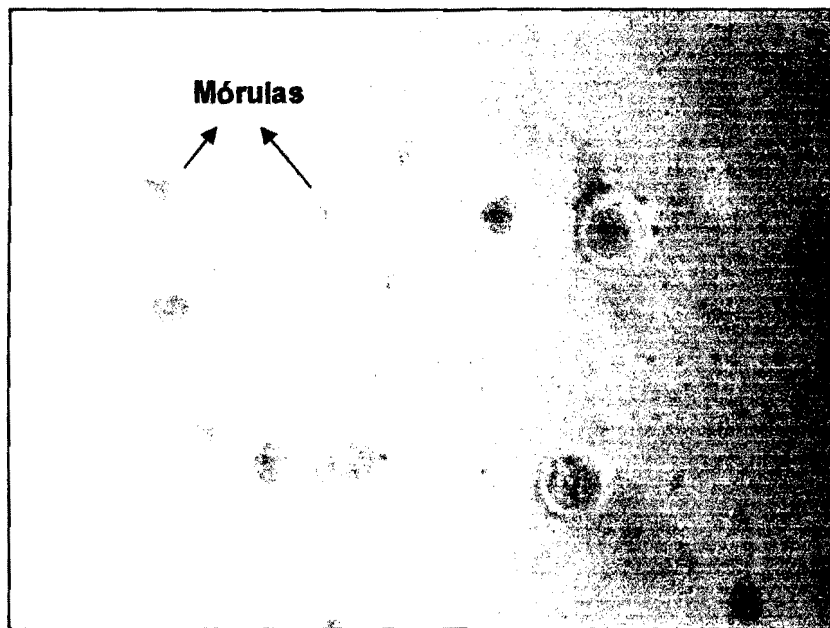


**Fotografía N° 05:** Ovocitos en división 4 observados a un aumento de 10 X.



**Fotografía N° 06:** Ovocitos en estadio de mórula observados a un aumento de 10X.





**Fotografía N° 07:** Ovocitos en estadio de mórula observados a un aumento de 10X.

## V. DISCUSIÓN

Se recolectaron 203 ovarios del Camal Municipal de Pilpichaca de los cuales se aspiraron todos los folículos presentes en el ovario, habiéndose recuperado un total de 909 ovocitos, haciendo un promedio de 4.5 ovocitos por ovario. En comparación con otros trabajos realizados, Ratto y col. (1999) recuperaron 2,2 COCs/ovario en llamas con 95% (308/324) seleccionados como aptos para el cultivo en medio de maduración *in vitro*. Se han recuperado con éxito COCs de alpaca y llama con procedimientos menos invasivos y que no requieren de una cirugía, utilizando la aspiración folicular transvaginal y laparoscopia. Mediante la aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía, Brogliatti y col. (2000) alcanzaron una tasa de colección de COCs de 65% en llamas no estimuladas frente a un 52% en llamas estimuladas hormonalmente para la superovulación. Posteriormente estos resultados han sido mejorados por Ratto y col. (2005) quienes trabajaron con llamas del Centro de Investigación y Producción Quimsachata de la Estación Experimental ILLPA – INIA – Puno. Logrando recuperar 71% y 74% de COCs con  $10,7 \pm 2,1$  y  $11,2 \pm 2,3$  en promedio en llamas superovuladas con FSH y eCG respectivamente. En el Perú también se ha utilizado la técnica de aspiración folicular guiada por ultrasonido para recuperar COCs en alpacas. Gamarra y col. (2008) lograron recuperar en

promedio 6 COCs/alpaca cuando el tratamiento para la sincronización y superovulación se hizo con 0,78 mg de progesterona + estradiol (Día = 0) y una dosis de 700 UI de eCG al momento del retiro de las esponjas con progesterona (Día = 7) y recuperaron 6,0 COCs en promedio por alpaca y cuando aplicaron otro tratamiento con LH (Día = 0) y eCG (Día = 2) recuperaron 6,1 COCs/alpaca. Los COCs de buena calidad fueron 7,4% y 64,9% con dispositivo intravaginal y sin este, respectivamente.

Después de haber realizado la recuperación de COCs se pusieron a madurar los ovocitos que tenían un cúmulus denso, según la categorización propuesta por De Losse y col. (1989). A continuación se pusieron a madurar por espacio de 24, 26, 48 y 72 h cada uno con 7 repeticiones en un medio de maduración compuesto por TCM-199 suplementado con 10% de FCS, 0,02 unid/mi de FSH + LH y 0.2 mM de piruvato de sodio 1 µg/ml de estradiol. En 24 h los ovocitos madurados tuvieron una media de 27,43, la misma media de ovocitos madurados se obtuvo a las 26 h, mientras que a las 48 h se obtuvo una media de 25 y a las 72 h se obtuvo una media de 23,71. Según los resultados obtenidos se puede deducir que el tiempo de maduración más adecuado oscila entre las 24 y 26 horas. Comparando con otros trabajos, para la maduración *in vitro* de ovocitos, se utilizan medios de cultivo clasificados por Gordon (1994). Estos se clasifican en medios simples y complejos. Un medio simple es aquel que contiene una Solución Salina Fisiológica tamponada usualmente con bicarbonato y adicionada de piruvato, lactato y glucosa. Un medio de maduración complejo contiene además de los constituyentes de un medio simple, aminoácidos, vitaminas, purinas y otras sustancias encontradas asociadas al suero sanguíneo. En camélidos se ha usado con éxito el Tissue Culture Medium - 199 (TCM-199) medio complejo compuesto por sales de Earle, con HEPES y bicarbonato, como estabilizadores de pH, y suplementado con

piruvato, lactato, vitaminas, aminoácidos, proteína con suero fetal bovino (Palma, 2001).

En otro estudio, Ratto y col. (2005), utilizando un medio de maduración consistente de TCM-199 suplementado con piruvato de Na 0,2 mM, sulfato de gentamicina 25 µg/ml, FSH 0,5 µg/ml, estradiol 17-β 1µg/ml y suero fetal bovino al 10%, encontraron 77,7%, 80,6% y 80,4% de maduración cuando utilizaron 28, 30 y 36 h respectivamente, para la maduración *in vitro* de ovocitos de llama no encontrando diferencias estadísticas significativas entre los 3 tiempos evaluados. Por otro lado, Sansinema y col. (2003), para la maduración *in vitro* de ovocitos de llama incrementaron LH en su protocolo de maduración, el medio de maduración que utilizaron estaba compuesto por TCM-199, 5 µg/ml de FSH, 10 µg/ml de LH, 1 mg/ml de estradiol 17b y 10% de suero fetal bovino, y obtuvieron 52% de ovocitos maduros. Posteriormente el mismo grupo de investigación (Sansinema y col., 2007) utilizaron un medio un tanto diferente para la maduración *in vitro* de ovocitos de llama consistente de TCM-199, 5 µg/ml de FSH, 10 µg/ml of LH, 10 ng/ml of EGF, 10 ng/ml de IGF-1 y 1 µg/ml de estradiol 17b y 10% de suero fetal bovino, mejorando su anterior tasa de maduración con 74% de ovocitos en metafase II luego de 30 h de maduración *in vitro*.

En alpacas, Gómez y col. (2002) así como Ratto y col (2007), han utilizado 26 h para la maduración *in vitro* de ovocitos recuperados por laparatomía ventral. Gómez obtuvo 46% y 40% de ovocitos en metafase II en alpacas donantes superovuladas con FSH y eCG, respectivamente. Ratto mejoró los resultados obtenidos por Gómez alcanzando 82% y 64% de ovocitos en metafase II para los mismos tratamientos superovulatorios en las alpacas donantes. Ruiz y Correa (2007) maduraron ovocitos de alpaca y llama durante 27 y 30 horas respectivamente en un medio compuesto por TCM-199 suplementado con piruvato de Na 0,2 mM, sulfato de gentamicina 50 µg/ml, FSH 0,02 unidades/ml,

estradiol 17- $\beta$  1 $\mu$ g/ml y suero fetal bovino al 10%. Obtuvieron tasas de 75% y 100% de maduración de ovocitos de llama y alpaca respectivamente por observación del primer corpúsculo polar. En este estudio se obtuvo 100% de maduración de los ovocitos de alpaca debido a que sólo 3 ovocitos fueron colocados a maduración *in vitro*, por lo que sería recomendable una mayor cantidad de ovocitos para obtener una real tasa de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca.

Luego de realizada la fertilización *in vitro* con semen fresco, habiéndose seleccionado los espermatozoides por el método Swin up, se obtuvo una tasa de segmentación de ovocitos en división 2 a las 24 h de 19,28%, a las 26 h un 21,86%, a 48 h de 1,86% y a las 72 h de 0,43. En relación a la tasa de segmentación, en ovocitos en división 4 a las 24 h se obtuvo un 14%, a 26 horas un 19%, a 48 h un 0.29% y a las 72 h no se obtuvo ningún resultado ya que estos fueron degenerándose. La tasa de segmentación de mórula a las 24 h se obtuvo un 4.86%, a 26 h un 9.57%, a 48 y 72 h no se obtuvo resultado alguno. De los resultados obtenidos anteriormente podemos deducir que el tiempo más adecuado de maduración *in vitro* para una buena fertilización *in vitro* se dio a las 26 h seguido de las 24 h. La tasa de blastocisto no se llegó a obtener en ninguno de los tiempos debido a que cuando llegaba a mórula comenzaba a degenerarse.

Haciendo comparaciones con otras investigaciones, Del Campo y col. (1995) indican que fecundaron *in vitro* ovocitos recuperados de alpacas superovuladas y los embriones de alpaca producidos desarrollaron hasta el estadio de blastocisto expandido. Del Campo y col. (1994), separaron epidídimos de testículos de llamas beneficiadas, obtuvieron los espermatozoides por centrifugación en gradiente de Percoll y fecundaron ovocitos de hembras beneficiadas madurados *in vitro* logrando por primera vez en llamas el desarrollo

de embriones producidos por FIV. En este trabajo recolectaron 1324 COCs de 98 ovarios de llamas beneficiadas, permitiéndoles disponer de gran cantidad de ovocitos para realizar diferentes tratamientos para la FIV, fijar ovocitos para evaluar el estado de maduración nuclear y describir el desarrollo embrionario producido después de la FIV. Un total de 234 ovocitos inseminados fueron cocultivados en células epiteliales de oviducto de llama (LLOEC) previamente preparadas. 32% dividieron a las 48 h de evaluación y a los 9 días de evaluación 15,8% detuvo su desarrollo entre 2-16 células, 5,6% desarrollaron hasta mórulas, 6,0% entre blastocistos tempranos y expandidos y 4,7 blastocistos eclosionados.

Conde y col (2006), utilizaron un sistema similar para FIV en llamas, pero a diferencia con Del Campo y col (1994), recuperaron los gametos de animales vivos, ya que es de esta manera en que la producción de embriones por FIV puede contribuir al mejoramiento genético recuperando gametos de animales de comprobada calidad genética. Los ovocitos fueron recuperados por punción folicular de ovarios expuestos por laparatomía lateral de hembras superovuladas y los espermatozoides fueron recuperados por electroeyaculación de llamas macho. El semen fue tratado con colagenasa para reducir su viscosidad. Los ovocitos aspirados fueron medidos y separados en 2 grupos: ovocitos colectados de folículos < 7mm y ovocitos colectados de folículos > 7mm. Los resultados de IVM fueron 29% y 78% para <7mm y > 7mm, respectivamente. Las tasas de división fueron 56% y 50% con y sin agentes capacitantes, también se reportaron 40,8% y 42,2% de división y 35% y 47% de blastocistos a los 8 días con y sin agentes capacitantes (heparina, penicilamina e hipotaurina), demostrando que la colagenasa no afecta la capacidad fecundante del semen y que es posible producir embriones de llama por FIV con semen fresco.

De los resultados obtenidos, se señala que no se dieron las condiciones necesarias, como es el caso de los medios que se utilizaron y esto nos lleva a pensar que hay que revisar las condiciones de cultivo a partir de la segmentación del segundo día, para intentar mejorar la tasa de desarrollo embrionario en alpacas. El otro problema que se tuvo es en la colecta de semen ya que este fue colectado mediante una vagina artificial horas antes de la fertilización, donde en la colecta de semen se observó un poco de contaminación de semen con polvo debido a que en el corral donde se encuentran las alpacas es de tierra y al momento de la colecta la alpaca que está en movimiento, hace que el semen se contamine con polvo, provocando en cierto modo menor viabilidad de espermatozoides.

Sin embargo en el Perú más de un grupo de investigadores viene trabajando en este camino. La importancia de lograr blastocistos radica en que es en este estadio de desarrollo en que los embriones pueden ser transferidos para lograr una preñez exitosa.

En Ayacucho es la primera prueba que se realiza en cuanto a la maduración y la fertilización *in vitro* de ovocitos demostrando que aquí también es posible producir embriones *in vitro* en alpacas y también en otro tipo de especies.

## VI. CONCLUSIONES

1. Para la producción *in vitro* de embriones de alpacas se obtuvo que en 24 y 26 h de maduración no tiene mucha diferencia significativa, mientras en 48 y 72 h no llegaron a desarrollarse y por ende se degeneraron.
2. El tiempo más adecuado de maduración de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones de alpacas fue de 26 horas seguido de 24 horas.
3. La tasa de segmentación en la producción *in vitro* de embriones de alpacas fue como sigue: ovocitos en división 2, a las 24 h en un 19,28%; a las 26 h en 21,86%, a las 48 h en 1,86% y a las 72 h en 0,43. La tasa de segmentación de ovocitos en división 4, a las 24 h se obtuvo un 14%, a las 26 h un 19%, a las 48 h un 0,29% y a las 72 h no se obtuvo ningún resultado ya que estos fueron degenerándose. La tasa de segmentación de mórula, a las 24 h se obtuvo un 4,86%, a 26 h un 9,57%, a 48 y 72 h no se obtuvo resultado alguno. No se llegó a obtener blastocisto alguno.



## VII. RECOMENDACIONES

1. Continuar con esta investigación para que así se llegue estandarizar los medios de cultivo exclusivamente para la fertilización *in vitro* en alpacas.
2. Para la realización de estos trabajos los componentes a usarse para la preparación de los medios de cultivo, deben proceder de preferencia de una sola empresa o laboratorio que provea este tipo de medios.
3. Para mejorar la tasa de segmentación, la preparación de los medios de cultivo debe realizarse con mucho cuidado teniendo en cuenta la concentración y el peso de cada componente.
4. La colección de semen se debe realizar en un lugar donde no haya mucha tierra ni polvo para que así no se contamine el semen y tengamos una buena viabilidad de espermatozoides.
5. Para preparar los medios de cultivo se debe contar con una balanza a lado y que esta sea permanente para no estar con el problema de trasladar de un lado para otro y así evitar que la balanza se descalibre y nos de falsos pesos.
6. Para trabajos posteriores tener en cuenta las razas de alpacas al momento de la colección de ovarios, y trabajarlos por separado.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Apaza, N., Olarte, U. y Málaga, J.** 1998. Empadre controlado de alpacas Huacaya en el Banco de Germoplasma de la E.E. ILLPA Puno. Memorias de la XXI Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Universidad Nacional del Altiplano. Puno-Perú.
2. **Apaza, N., Sapana, R., Huanca, T. y Huanca, W.** 2001. Inseminación Artificial en alpacas con semen fresco en comunidades campesinas. Memorias de la XIV Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.
3. **Brogliatti, M., Palasz, T., Rodríguez, H., Mapletoft, J. and Adams, P.** 2000. Transvaginal collection and ultrastructure of llama (*Lama glama*) oocytes. *Theriogenology* (54) 1269-1279.
4. **Bustinza, V.** 2001. La alpaca: conocimiento del gran potencial andina. Universidad Nacional del Altiplano. Puno-Perú
5. **Cárdenas, O., Huanca, T., Sapana, R. y Alarcón, V.** 1999. Avances de inseminación artificial de llamas con semen congelado. XXII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Huancavelica-Perú.
6. **Conde, P., Herrera, C., Chaves, M., Giuliano, S., Director, A., Trasorras, V., Pinto, M., Carchi, M., Stivale, D., Rutter, B., Agüero, A., Miragaya, M. and Pasqualini, R.** 2006. *In vitro* production of llama embryos by IVF or ICSI. *Reproduction, Fertility and Development* 19 (1): 237-238.
7. **Del Campo, M., Donoso, M. and Del Campo, C.** 1992. *In vitro* maturation of Llama (*Lama glama*) oocytes. *Proc 12th Int Cong Anim Reprod*, (01): 324.
8. **Del Campo, M., Del Campo, C., Donoso, M., Berland, M. and Mapletoft, R.** 1994. *In vitro* fertilization and development of Lama glama oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology* (41): 1219-1229.
9. **Del Campo, M., Del Campo C., Adams, G. and Mapletoft, R.** 1995. The application of new reproductive technologies to South American Camelids. *Theriogenology* (43): 21-30.
10. **De Loose, F., Van Vliet, P., Van Maurik, P. and Kruij, T.** 1989. Morphology of immature oocytes. *Gamete Res.* (24): 197-204.

11. **Fernández–Baca, S.** 1991. Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Oficina regional de la FAO para América latina y el Caribe (1): 1-419.
12. **Fernández, S.** 1993. Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. *Ani. Reprod. Sci.* (33): 307-323.
13. **Freshney, I.** 1987. The culture environment. En: Culture of animal cells, a manual of basic technique. AR Liss, New York-USA.
14. **Fuladi, A., Waddington, D. and Campbell, K.** 1998. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development *in vitro*. A comparative evaluation of antral follicle culture with other methods. *Biol. Reprod.* (50):390-400.
15. **Gamarra, G., Gallegos, A., Alvarado, E., Asparrin, M. and Vivanco, W.** 2008. Techniques for ovum pick-up in gonadotropin-treated alpacas. *Reproduction, Fertility and Development* (20): 159–160.
16. **Gomez, G., Ratto, M., Berland, M., Wolter, M. and Adams, G.** 2002. Superstimulatory response and oocyte collection in alpacas. *Theriogenology*. 57, (1): 584.
17. **Gordon, I.** 1994. Laboratory production of cattle embryos. CAB internacional, Cambridge-United Kingdom.
18. **Hafez, E., Hafez B.** 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. Ed. Hill Interamericana editores. México.
19. **Hoshi, H.** 2003. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology* 50:675-685
20. **Lonergan, P., Monomaghan, P., Rizo, A., Boland, M., and Gordon, I.** 1994. The effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* (37): 48-53.
21. **Lonergan, P., Dinnyes, A., Fair, T., Yang, X. and Boland, M.** 2005. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. *Mol. Reprod. Dev.* (57): 204-209.
22. **Marshall, V., Wilton, L., and Moore, H.** 1998. Parthenogenic activation of marmoset (*Callithrix jacchus*) oocytes and the development of marmoset parthenogenic activation of rhesus monkey oocytes and reconstructed embryos. *Biol. Reprod.* (59):1491-1497.

23. **Mitalipov, S., Nusser, K., and Wolf, D.** 2001. Parthenogenic activation of resus monkey and recontruted embryos. *Biol. Reprod.* (65):253-259.
24. **Palma, G.** 2001. Biotecnología de la reproducción. Ed. INTA. Bariloche-Argentina.
25. **Pieterse, M., Kappen, K., Kruip, T. and Tarverme, M.** 1987, Aspiration of bovine oocyte during transvaginal ultrasound scanning of the bovine ovaries. *Theroogenologiy* (30):751-762,
26. **Rath, D.** 2001. Producción *in vitro* de embriones porcinos. En: "Biotecnología de la Reproducción". (Palma, G. Editor). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Bariloche-Argentina.
27. **Ratto, M., Wolter, M., Gómez C., Berland M. and Adams G.** 1999. *In vitro* maturation of llama oocytes. En: "II Congreso Mundial sobre Camélidos". Cusco-Perú.
28. **Ratto, M., Berland, M., Huanca, W., Singh, J. and Adams, G.** 2005. *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes. *Therigenology* (63): 2445-2457.
29. **Ratto, M., Gómez, C., Berland, M. and Adams, G.** 2007. Effect of ovarian superstimulation on COCs collection and maturation in alpacas. *Animal Reproduction Science* (97): 246-256.
30. **Ruiz, J.** 2005. Comercialización de productos y subproductos de la explotación de camélidos sudamericanos. En: "IV Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos". Curitiba-Brasil.
31. **Ruiz, J. y Correa, J.** 2007. Maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca y llama aspirados vía laparoscópica. En: "I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos". Huancavelica-Perú
32. **Ruiz, J., Correa, J., Ayuque, G., Landeo, L., Yaranga, M. y Zacarías, A.** 2007. Producción *in vitro* de embriones partenogénéticos de alpaca y llama. En: "I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos". Huancavelica-Perú.
33. **Saeki, K., Nacao, M., Hoshi, M. and Nagai, M.** 1995. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation of bovine oocyte in a protein- free medium. *Therigenolgy* 43:751-759.

- 34. Sansinema, M., Taylor, S., Taylor, P., Denniston, R. and Godke, R.** 2003. Production of nuclear transfer llama (*Lama glama*) Embryos from *in vitro* matured llama oocytes. *Cloning Stem cells* (5): 191-198.
- 35. Sansinema, M., Taylos, S., Taylor, P., Schmidt, E., Denniston, R. and Godke, R.** 2007. *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Animal Reproduction Science* (99): 342-353.
- 36. Sumar, J. y Leyva, C.** 1981. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*Lama pacos*). Memorias del IV convención internacional sobre camélidos sudamericanos. Punta Arenas - Chile.
- 37. Wheeler, J.** 1991. Origen, evolución y status actual. En: Avances y Perspectivas de los Camélidos Sudamericanos. Ed. Saúl Fernández-Baca. Oficina Regional de la FAO Para América Latina y el Caribe. Santiago – Chile.

## ANEXOS

### 1. Composición de medios de cultivo

#### 1.1. Medio de Maduración

Componentes	Concentración final	Volumen/10 ml
TCM-199	90%	9ml
FCS	10%	1ml
FSH + LH <sup>1</sup>	0,02 unid./ml	10 µl (stock)
Piruvato de sodio <sup>2</sup>	0,2mM	20 µl (stock)
Estradiol 17-β <sup>3</sup>	1 µg/ml	10 µl (stock)

Usar dentro del día de preparación

1. FSH y LH stock: 0.1 mg/FSH y 0.5 mg/LH 1000 µl de suero fisiológico.
2. Piruvato de sodio stock: 11 mg ácido pirúvico/1000 µl de suero fisiológico.
3. Estradiol stock: Estradiol 17-β 5 mg/5000 µl de etanol absoluto.

#### 1.2. Fluido Sintético del Oviducto Modificado, mSOF SOF-IVC (Takahashi y col., 1996)

Componentes	Concentración	Volumen /50 ml
H <sub>2</sub> O Sigma	–	39ml
Natrium Tricitrato		0.005 g
Myo inositol		0.025 g
SOF-Stock A	–	5ml
SOF- Stock B		5ml
SOF- Stock C		0.5ml
SOF- Stock D		0.5ml
BME <sup>1</sup>	50X	1.5 ml
MEN <sup>2</sup>	100X	0.5ml
L- Glutamina		50 µl

Duración una semana 4 °C

1. BME: 12 aminoácidos esenciales para medio base Tagle.
2. MEM: 7 aminoácidos no esenciales para medio esencial mínimo.

### 1.3. Stock A

Componentes	Concentración	Cantidad/50 mi
NaCl	58.44 g/mol	3.145 g
KCl	74.55 g/mol	0,267 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.1 g/mol	0.081 g
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	120.4 g/mol	0.091 g
H <sub>2</sub> O Sigma	--	40ml
DL-Acido láctico	112.1 g/mol	300 µl
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2H <sub>2</sub> O)	1,19 mM	0,162 g
CaCl <sub>2</sub> (2H <sub>2</sub> O)	1,71 mM	0,2514 g
MgCl <sub>2</sub> (2H <sub>2</sub> O)	0,49 mM	0,0996 g
Rojo fenol (0,5%)	--	100 µl
Agua mili Q	--	Completar hasta 100 ml

Duración un mes a 4° C

### 1.4. Stock B

Componentes	Concentración	Cantidad/50 mi
NaHCO <sub>3</sub>	84.01 g/mol	1,050 g
Rojo fenol	--	15 µl
H <sub>2</sub> O Sigma	--	50ml

Duración un mes a 4° C.

### 1.5. Stock C

Componentes	Concentración	Cantidad/10 mi
Piruvato Na	11.0 g/mol	0.080 g
H <sub>2</sub> O Sigma	--	10 ml

### 1.6. Stock D

Componentes	Concentración	Cantidad/10 mi
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	1,47 g/mol	0,262 g
H <sub>2</sub> O Sigma	--	10 ml

**1.7. Medio SPERM-TALP (Berland, M. & Ratto, M., 1997)**

Componente	Preparación 50 ml (en agua pura)
Na Cl	5,844 gr
KCl	3,728 gr
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,689 gr
Ca Cl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	7,350 gr
Mg Cl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	1,016 gr
Mantener Refrigerado (Conservar en frascos estériles por 3 a 5 meses)	

**1.8. Medio FERT-TALP (medio de fecundación) (Berland, M. & Ratto, M., 1997)**

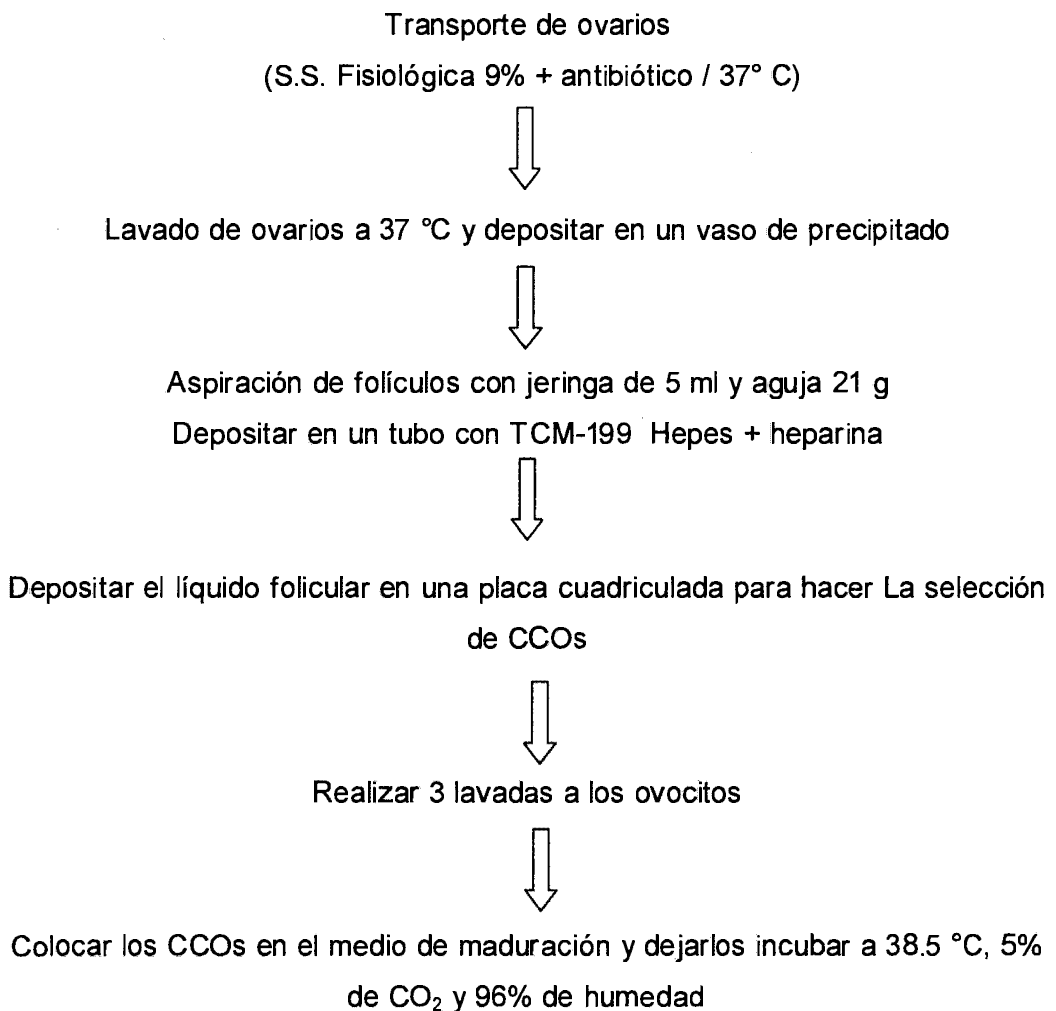
Componente	Preparación para 100 ml
NaCl	666 mg
KCl	23,8 mg
NaHCO <sub>3</sub>	210 mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,8 mg
Lactato de Na	187 ul
Ca Cl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	29,4 mg
Mg Cl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	10 mg
Rojo Fenol	(1%) 100 ul; (0,5%) 200 ul

Suplemento para 10 ml de medio (agregar antes de filtrar y usar)

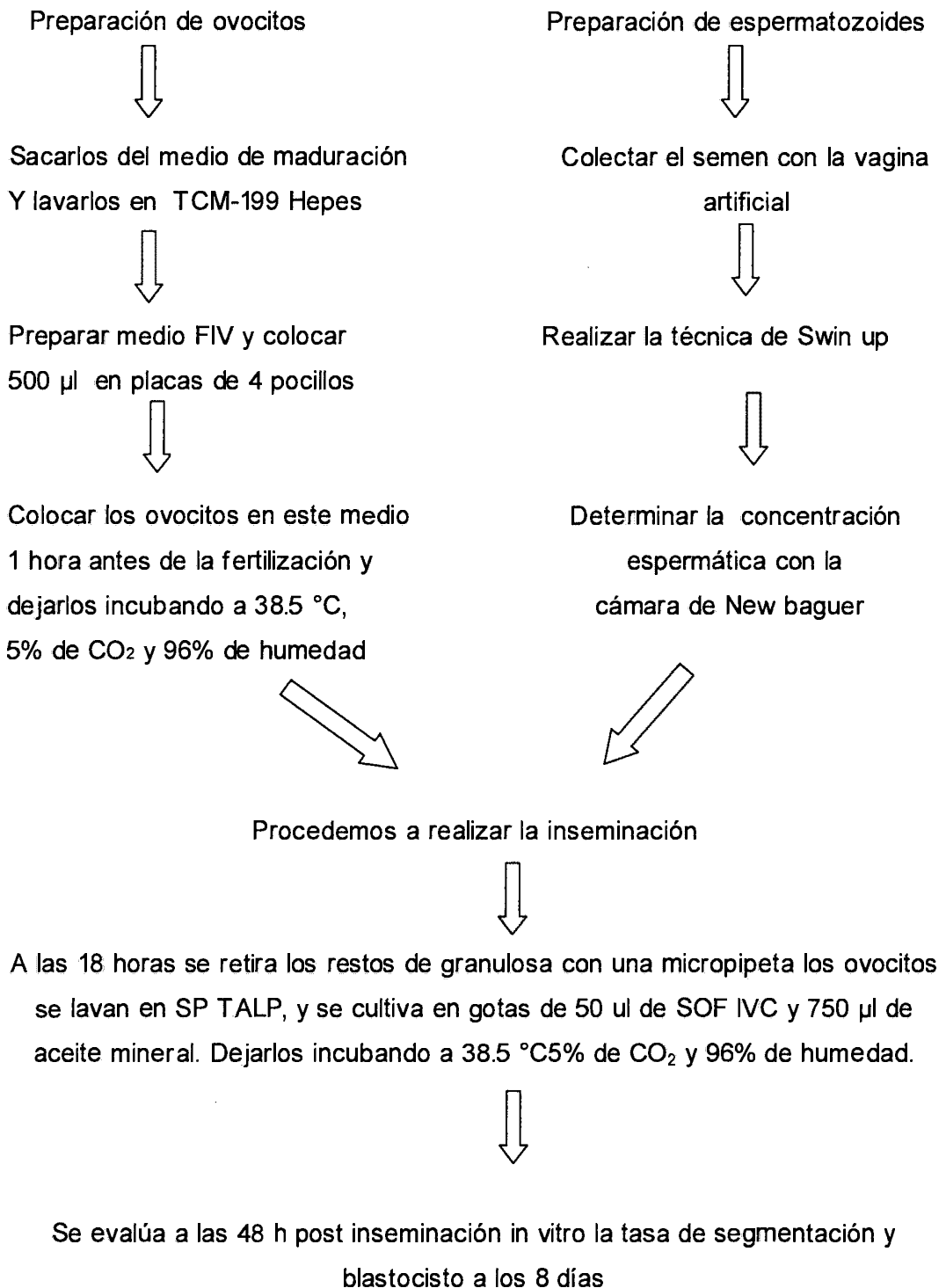
Componente (mM)	10 ml de medio
Piruvato Na 0,2mM	10 ul
Gentamicina	50 ug/ml, 10 ul stock
BSA Faty Free (A-6003)	6 mg/ml
Filtrar 0,22 um	



## 2. Flujograma de maduración *in vitro* de ovocitos en alpacas



### 3. Flujograma de fertilización *in vitro* de ovocitos de alpacas



## 4. Análisis estadístico utilizando análisis de varianza

### 4.1. Análisis Descriptivo

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
		Limite inferior	Limite superior	Limite inferior	Limite superior	Limite inferior	Limite superior	Limite inferior	Limite superior
OVOCITOS EN DIVISION 2 (%)	24	7	19,2857	3,8606686	1,459195	15,715191	22,85623	16,0000	27,0000
	26	7	21,8571	3,8047589	1,438063	18,338328	25,37595	18,0000	29,0000
	48	7	1,85714	2,4784788	,9367769	-,435068	4,149353	,0000	6,0000
	72	7	,428571	1,1338934	,4285714	-,620105	1,477248	,0000	3,0000
	Total	28	10,857143	10,3520057	1,956345	6,843054	14,87123	,0000	29,0000
OVOCITOS EN DIVISION 4 (%)	24	7	14,000000	5,1639778	1,951800	9,224117	18,77588	7,0000	22,0000
	26	7	19,000000	4,0000000	1,511857	15,300617	22,69938	12,0000	25,0000
	48	7	,285714	,7559289	,2857143	-,413403	,984832	,0000	2,0000
	72	7	,000000	,0000000	,0000000	,000000	,000000	,0000	,0000
	Total	28	8,321429	9,0678658	1,713665	4,805277	11,83758	,0000	25,0000
MORULA (%)	24	7	4,857143	3,8483144	1,454526	1,298046	8,416240	,0000	10,0000
	26	7	9,571429	4,0355563	1,525296	5,839162	13,30369	6,0000	16,0000
	48	7	,000000	,0000000	,0000000	,000000	,000000	,0000	,0000
	72	7	,000000	,0000000	,0000000	,000000	,000000	,0000	,0000
	Total	28	3,607143	4,8253903	,9119131	1,736052	5,478234	,0000	16,0000

### 4.2. Análisis de varianza (ANOVA)

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
OVOCITOS EN DIVISION 2 (%)	Inter-grupos	2672,571	3	890,857	96,807	,000
	Intra-grupos	220,857	24	9,202		
	Total	2893,429	27			
OVOCITOS EN DIVISION 4 (%)	Inter-grupos	1960,679	3	653,560	60,461	,000
	Intra-grupos	259,429	24	10,810		
	Total	2220,107	27			
MORULA (%)	Inter-grupos	442,107	3	147,369	18,957	,000
	Intra-grupos	186,571	24	7,774		
	Total	628,679	27			

## 5. Contrastación de promedios con la Prueba de Duncan

### 5.1. Prueba de Duncan para ovocitos en división 2 (%)

Hora	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
72	7	,428571	
48	7	1,857143	
24	7		19,285714
26	7		21,857143
Sig.		,387	,126

**5.2. Prueba de Duncan para ovocitos en división 4 (%)**

Hora	N	Subconjunto para alfa= .05		
		2	3	1
72	7	,000000		
48	7	,285714		
24	7		14,000000	
26	7			19,000000
Sig.		,872	1,000	1,000

**5.3. Prueba de Duncan para Mórula (%)**

Hora	N	Subconjunto para alfa= .05		
		2	3	1
48	7	,000000		
72	7	,000000		
24	7		4,857143	
26	7			9,571429
Sig.		1,000	1,000	1,000

## MATRIZ DE CONSISTENCIA

TEMA: Evaluación del tiempo de maduración de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones de Lama pacos "alpaca". Ayacucho 2009  
 FORMULADO POR: Bach. Raquel Ochante Pichardo

Problema	Objetivos	Marco teórico	Variables	Metodología
<p>¿Cuál será el tiempo de maduración de ovocitos mas adecuado para la producción <i>in vitro</i> de embriones en Lama pacos "alpaca"?</p>	<p><b>OBJETIVO GENERAL</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Evaluar tres tiempos de maduración de ovocitos para la producción <i>in vitro</i> de embriones de alpacas</li> </ul> <p><b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Seleccionar el tiempo mas adecuado de maduración de ovocitos para la producción <i>in vitro</i> de embriones de alpacas.</li> <li>- Establecer la tasa de segmentación y de blastocisto en la producción <i>in vitro</i> de embriones de alpacas.</li> </ul>	<p>El ovocito en la mayoría de mamíferos, la meiosis se inicia durante la vida fetal pero se detiene en el diploteno de la profase de la primera división meiótica, lo que ocurre cercano al nacimiento (Palma, 2001) la maduración ocurre <i>in vivo</i> al interior del folículo y es el proceso durante el cual se produce la reactivación de la división meiótica hasta alcanzar la metafase de la segunda división meiótica momento en el que ovocito retorna al arresto meiótico hasta que sea fecundado o activado artificialmente (Rath, 2001).</p> <p>Para la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos, se utilizan medios de cultivo clasificados por (Gordon, 1994). En medios simples y medios de cultivo clasificados en medios simples y complejos. Un medio simple es aquel que contiene una solución salina fisiológica bufferada usualmente con bicarbonato y adicionada de piruvato, lactato y glucosa. Un medio de maduración complejo contiene además de los constituyentes de un medio simple, aminoácidos, vitaminas, purinas y otras sustancias encontradas asociadas al suero. En camélidos usado con éxito es el Tissue Culture Medium - 199 (TCM-199) medio complejo compuestos por sales Earle, con HEPES y bicarbonato, como estabilizadores de pH, y suplemento con piruvato lactato, vitaminas aminoácidos proteína con suero fetal bovino (Palma, 2001).</p> <p>La fecundación <i>in vitro</i> (FIV) es el procedimiento por medio del cual los ovocitos maduros son cultivados junto con espermatozoides y de esta forma fecundados, para esto los espermatozoides deben ser sometidos previamente a un proceso de preparación <i>in vitro</i> con el objetivo de iniciar su capacitación y desencadenar la reacción acrosómica (Palma, 2001). La utilización de la fecundación <i>in vitro</i> en camélidos sudamericanos podría ser una alternativa para el mejoramiento genético de camélidos domésticos y para la preservación de los camélidos silvestres.</p>	<p><b>VARIABLE INDEPENDIENTE:</b>                      Tiempos de maduración de ovocitos.</p> <p><b>VARIABLE DEPENDIENTE:</b>                      Producción <i>in vitro</i> de embriones de alpacas.</p>	<p>Para el desarrollo de la investigación Evaluación de protocolos de maduración de ovocitos para la producción <i>in vitro</i> de embriones de Lama pacos "alpaca", se utilizará el método científico como método general de investigación y como métodos auxiliares recurrimos al método experimental.</p> <p>La muestra se tomará de manera no probabilística por las características de las mismas, para cuyo efecto, se considerará los criterios: oportunidad y cantidad de beneficios.</p> <p>Como unidad de muestra se tomará 200 ovarios de alpaca beneficiados del Camal Municipal de Pílpichaca.</p> <p>Para la obtención de ovocitos se realizará mediante aspiración de los folículos del ovario para luego ser madurados <i>in vitro</i> pasada las 24 h se procederá a realizar la fecundación <i>in vitro</i>. A las 18 h de post inseminación <i>in vitro</i> se realizará el cultivo de embriones y a partir de la 48 h se evaluará la tasa de segmentación.</p>

**Evaluación del tiempo de maduración de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones de *Lama pacos* "alpaca". Ayacucho 2009.**

Raquel Ochante<sup>1</sup> Fidel Mujica<sup>2</sup> Marco Cabrera<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Formación Profesional de Biología - Biotecnología.

<sup>2</sup>Laboratorio de Biotecnología - UNSCH.

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Innovación Agraria – EEA. Canaán.

**RESUMEN**

El objetivo principal del presente trabajo es el de evaluar tres tiempos de maduración de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones de alpacas, este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán de Ayacucho, para lo cual se recolectó 203 ovarios obtenidos del Camal Municipal de Pilpichaca y trasladadas en solución salina fisiológica a 37° C al laboratorio mencionado. Luego se realizó la aspiración de los folículos obteniendo 909 ovocitos, equivalente a un promedio de 4,5 ovocitos/alpaca, luego se realizó la selección de ovocitos y la maduración *in vitro* (MIV) por un tiempo de 24, 26, 48 y 72 h obteniéndose a las 24 y 26 h una media de 27,43, a las 48 h una media de 25,0 y a las 72 h una media de 23,71, seguidamente se realizó la fertilización *in vitro* con semen fresco obtenido a partir de una colecta con vagina artificial, el cual fue capacitado y seleccionado por la técnica de Swin up. Se obtuvo como resultado que la tasa de segmentación de ovocitos en división 2 a las 24 h es de 19,28%, a las 26 h un 21,86%, a 48 h un 1,86% y a las 72 h un 0,43. La tasa de segmentación de ovocitos en división 4 a las 24 h fue 14%, a 26 h un 19%, a 48 h un 0,29% y a las 72 h 0%. La tasa de segmentación de mórula a las 24 h fue de 4,86%, a 26 h un 9,57%, a 48 y 72 h no se obtuvieron resultado alguno. La tasa de blastocisto no se llegó a obtener. En conclusión se evaluó 4 tiempos de maduración y el tiempo más adecuado para la MIV es de 26 h, seguida de 24 h.

**Palabras claves:** Ovocitos, maduración *in vitro*, fecundación *in vitro*, embriones, alpaca.

**ABSTRACT**

The main objective of this study is to evaluate three stages of maturation of oocytes for *in vitro* embryo production in alpacas, this work was conducted at the Laboratory of Reproductive Biotechnology Agricultural Experiment Station Canaan Ayacucho, for which it was collected 203 ovaries from the slaughterhouse and moved Municipal Pilpichaca in physiological saline at 37 ° C to the laboratory referred, was performed after aspiration of 909 follicles oocytes obtained, equivalent to an average of 4.5 oocytes / alpaca, then made the selection of oocytes and *in vitro* maturation (IVM) for a period of 24, 26, 48 and 72 h was obtained at 24 and 26 h an average of 27.43, at 48 h an average of 25.0 and 72 h half of 23.71, then was carried out *in vitro* fertilization with fresh semen obtained from of a collection and artificial vagina, which was trained and selected by the technique of Swin up. The result was that the rate of segmentation of oocytes in Division 2 at 24 h is 19.28%, at 26 h a 21.86% to 1.86% 48 h and 72 h a 0.43. The segmentation rate of oocytes in division 4 at 24 h was 14%, 26 h by 19% to 0.29% 48 h and 72 h 0%. The segmentation rate morula at 24 h was 4.86% to 9.57% a 26 h, 48 and 72 h did not obtain any result. The blastocyst rate was not obtained. In conclusion evaluated four maturation times and the best time for IVM is 26 h, followed by 24 h.

**Keywords:** oocytes, *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, embryo, alpaca.

**Correspondencia**

Raquel Ochante Pichardo

e-mail [raquel\\_op19@hotmail.com](mailto:raquel_op19@hotmail.com)

Celular: 966145570

Fac. Cs. Biológicas UNSCH Ciudad Universitaria.

Av. Independencia s/n

Teléfono (066)-318553

**INTRODUCCION**

La alpaca (*Lama pacos*) constituye un recurso genético de gran importancia social, económica, cultural y científica para el Perú y en algunas zonas como en la región de Ayacucho, estas se localizan entre los 4000 y 4800 m.s.n.m.

Hoy en día, la producción de camélidos sudamericanos cobra gran importancia en el entorno socio-económico en los productores de las regiones altoandinas del Perú, aprovechando de esta manera los subproductos de estas especies como la fibra, carne, pieles y estiércol (Cárdenas y col., 1999).

Sin duda la aplicación de la biotecnología reproductiva en parte puede contribuir a superar los bajos índices de fertilidad y aportar al mejoramiento genético en estas especies sobretodo en la multiplicación de animales de alto valor productivo así convirtiéndose en reproductores para los criadores de camélidos sudamericanos en nuestro país.

Por otro lado, el desarrollo de biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial, la transferencia de embriones y recientemente el desarrollo de protocolos para la fecundación *in vitro*, han contribuido a la mejora genética en muchas especies domésticas. Sin embargo la aplicación de la biotecnología reproductiva se encuentra en un estado formativo en especies domésticas de camélidos sudamericanos.

A pesar de esta realidad, en la actualidad existen grupos de investigación sobre la fisiología reproductiva de los camélidos sudamericanos en distintos países. Además, estos conocimientos están permitiendo la investigación en la aplicación de la biotecnología reproductiva, como la sincronización de la dinámica folicular, la inseminación artificial, la transferencia de embriones, la fertilización *in vitro* y en los últimos años la inyección intracitoplasmática de espermatozoides y la transferencia nuclear. Todos estos avances permiten cada día entender mejor los procesos involucrados en la función reproductiva de estas especies.

La aplicación de la biotecnología reproductiva hoy en día, es una alternativa en la mejora de los camélidos sudamericanos, puesto que de esta manera se acorta el tiempo de generación y se acelera el mejoramiento genético. Todo esto por las técnicas de fecundación *in vitro* (FIV) lo que motivó para trabajar con ovarios de camal hasta establecer el tiempo óptimo para la maduración y fecundación *in vitro* (FIV) de ovocitos de alpacas, para que en un futuro se pueda extraer de una alpaca de excelente calidad genotípica como fenotípica.

Al establecer la técnica adecuada en la producción de embriones por maduración *in vitro* (MIV) y fecundación *in vitro* (FIV) permitirá al productor alpaquero, tener una alternativa en la mejora de su rebaño acortando tiempo y dinero para lograr un rebaño de excelente calidad que le brinde mejores posibilidades de vida.

Para el presente trabajo de investigación se tuvo como objetivos:

- Evaluar tres tiempos de maduración de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones de alpacas.
- Seleccionar el tiempo más adecuado de maduración de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones de alpacas.
- Establecer la tasa de segmentación y de blastocisto en la producción *in vitro* de embriones de alpacas.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

##### Ubicación

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán – INIA Ayacucho ubicado a 2760 m.s.n.m.

Las muestras de ovarios se recolectaron del Camal Municipal de Pilpichaca por lo que se tuvo que viajar al distrito de Pilpichaca, provincia de Huaytará, departamento de Huancavelica ubicado a 4000 m.s.n.m.

##### Recolección y transporte de ovarios de alpaca *post mortem*

Los ovarios utilizados procedieron de alpacas sacrificadas en el Camal Municipal de Pilpichaca. Tras su recogida se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán, en Solución Fisiológica, con penicilina (100 UI/ml) y sulfato de estreptomina (100 mg/ml) a una temperatura promedio de 37 °C. A su llegada al laboratorio, los ovarios fueron lavados dos veces con agua destilada y una en solución salina fisiológica con antibióticos y se mantuvo en suero salino estéril a 37 °C con las mismas cantidades de antibióticos de su recogida hasta el momento de la aspiración.

##### Recuperación y selección de ovocitos

Los Complejos cúmulo-ovocito (COCs) de ovarios de alpacas fueron recuperados con una aguja de 21 G y una jeringa de 5 ml. El líquido folicular con los COCs recuperados fue depositado en un tubo graduado de 15 cc que reposó en baño María a 37° C. Luego el contenido se vació en una placa de Petri para ser diluido en solución de HEPES; ésta placa previamente fue señalizada para facilitar la búsqueda de los COCs. La selección de los COCs (TABLA I) se realizó con una jeringa Hamilton de 100 µl bajo una lupa estereoscópica, solamente los COCs de categoría 1 y 2 fueron madurados *in vitro*.

**TABLA Nº 01: CLASIFICACIÓN DE COMPLEJOS CÚMULO-OVOCITO (COCs) DE ALPACAS**

Categorías	Características por Categoría
1	COCs con cúmulos de capas múltiples (>5 capas), compacto, claro y transparente y citoplasma con granulación fina y homogénea.
2	COCs parcialmente rodeados por células del cúmulo (entre 2-5 capas), con cúmulos algo más oscuros y menos transparentes y con citoplasma de granulación más gruesa y más oscura que en la categoría 1.
3	COCs con cúmulo menos compacto y más oscuro que en la categoría 1 ó 2 y citoplasma con manchas oscuras.
4	Incluye a los ovocitos con cúmulo expandido, parcialmente desnudos o totalmente desnudos.

Fuente: De Loose y col., (1989).

##### Maduración *in vitro* de ovocitos (MIV)

Los complejos cúmulo-ovocito (COCs) de alpacas fueron seleccionados y lavados 3 veces en Medio de Maduración (TCM -199 modificado con HEPES) compuesto por sales de Earles y FSH + LH (Sigma) 0,02 unidades/ml, 0,2 mM de piruvato de sodio, estradiol 17-β (sigma) 1µg/ml y suero fetal bovino al 10%. La MIV se realizó en placas de 4 pocillos en grupos de 50 COCs (máximo) por 500 µl de medio. Los COCs fueron cultivados a 38,5 °C por un lapso de 24, 26, 48, 72 h, con 5% de CO<sub>2</sub> y 96% de humedad.

##### Método de recuperación de espermatozoides

Para la colección de semen se tuvo que elaborar una vagina artificial para lo cual se utilizó un tubo de PVC de 20 cm de largo y 6 cm de diámetro donde se colocó por dentro dos fundas de látex, una funda recta y una funda cónica a la que se le colocó en uno de sus extremos un tubo graduado de 15 cc para recoger el semen colectado. Para la colección de semen se tuvo que colocar agua a 37 °C dentro del tubo esto para asemejar a la vagina de una alpaca. Se utilizó una alpaca hembra vacía para que sirva como maniquí y una vez que se encontraron en posición de cópula se procedió a coger el pene de la alpaca macho, desviarlo e introducirlo en la vagina artificial hasta que este eyacule, durante un promedio de 10 a 15 minutos. Una vez obtenido el semen fue trasladado al laboratorio para realizar los lavados y la capacitación respectiva.

##### Lavado de espermatozoides

###### Método de separación por Swim up

- Se colocó en tubos de centrifugación de 15 cc, 2 ml de semen con 2 ml de medio de cultivo Sp-Talp
- Se centrifugó a 1800 rpm por 5 m, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 2 ml de medio de cultivo Fert-Talp.
- Se centrifugó a 1800 rpm por 5 m, paralelamente en un tubo Eppendorf se colocó 1 ml del medio de cultivo Fert-Talp y se llevó a la incubadora de CO<sub>2</sub>. Luego de la centrifugación se descartó el sobrenadante y al pellet se agregó 100 µl de medio Fert-Talp y se homogenizó, luego con una micropipeta se tomó todo el pellet diluido y lentamente se agregó al fondo del tubo Eppendorf que contenía 1ml de cultivo Fert-Talp, sin que se produzca la disociación del pellet.
- Se colocó en la incubadora de CO<sub>2</sub> a 38°C con una inclinación del tubo en 45° y se dejó migrar los espermatozoides por 30 a 60 min.
- Se tomó 10 µl del sobrenadante, se colocó en una Cámara de Neubauer y se procedió a determinar la concentración de espermatozoides.
- Se realizó la inseminación de acuerdo a la concentración de espermatozoides.

##### Cultivo de embriones

Pasadas las 18 h de post inseminación *in vitro*, se retiraron las células de la granulosa y los detritos celulares con una micropipeta en Medio Fert-Talp. Los ovocitos libres de cúmulus se lavaron en Medio Fert-Talp y en SOF-IVC 2 veces en cada uno y se cultivaron en gotas de 50 µl de SOF-IVC durante 8 días a 38.5 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y 96% de humedad.

**Evaluación de la tasa de desarrollo**

La segmentación fue evaluada a las 48 horas post-inseminación *in vitro* y la tasa de mórulas y blastocistos a los 8 días.

**Análisis de datos**

Todos los experimentos se repitieron 7 veces. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos fueron comparados utilizando análisis de varianza (ANOVA). Se utilizó la prueba de Duncan para contrastar la diferencia entre promedios.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

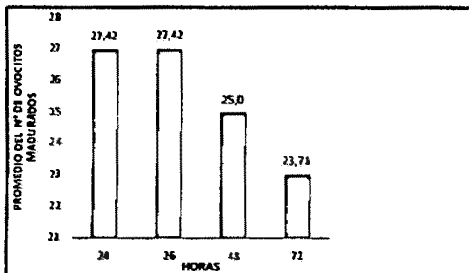


Figura Nº 01: Valores promedio de ovocitos madurados *in vitro* de *Lama pacos* "alpaca" en relación al tiempo.

TABLA Nº 02: TASA DE SEGMENTACIÓN DE OVOCITOS DE *Lama pacos* "alpaca" A DIFERENTES TIEMPOS.

HORAS	OVOCITOS MADUROS (Nº)			OVOCITOS EN DIVISIÓN 2 (%)			OVOCITOS EN DIVISIÓN 4 (%)			MÓRULA (%)		
	N	Ovov		N	Ovov		N	Ovov		N	Ovov	
		Medio	Sp.		Medio	Sp.		Medio	Sp.		Medio	Sp.
24	7	27,42	0,31	7	19,28	3,80	7	14,6	5,18	7	4,67	3,95
26	7	27,43	7,21	7	21,88	3,80	7	19,0	4,00	7	0,57	4,63
48	7	25,00	9,17	7	1,88	2,46	7	0,28	0,76	7	0,00	0,00
72	7	23,71	4,48	7	0,43	1,13	7	0,00	0,00	7	0,00	0,00

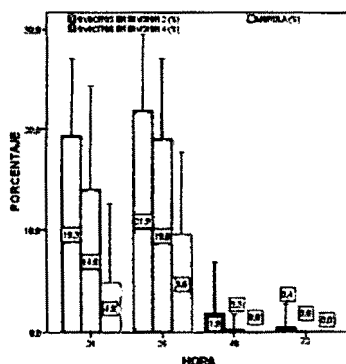


Figura Nº 02: Porcentaje de la tasa de segmentación de ovocitos de *Lama pacos* "alpaca" según estadio a diferentes tiempos.

TABLA Nº 03: TASA DE SEGMENTACIÓN PROMEDIO DE OVOCITOS DE *Lama pacos* "alpaca" EN CONDICIONES *in vitro*.

DÍA	Nº REPETICIONES	OVOCITOS MADUROS (Nº)	OVOCITOS EN DIVISIÓN 2 (%)	OVOCITO 4 EN DIVISIÓN 4 (%)	MÓRULA (%)	BLASTOCISTO (%)
24	7	192	19,28	14,00	4,68	0,00
26	7	192	21,88	19,00	0,57	0,00
48	7	175	1,88	0,28	0,00	0,00
72	7	186	0,43	0,00	0,00	0,00

Se recolectaron 203 ovarios del Camal Municipal de Pilpichaca de los cuales se aspiraron todos los folículos presentes en el ovario, habiéndose recuperado un total de 909 ovocitos, haciendo un promedio de 4.5 ovocitos por ovario. En comparación con otros trabajos realizados, Ratto y col. (1999) recuperaron 2,2 COCs/ovario en llamas con 95% (308/324) seleccionados como aptos para el cultivo en medio de maduración *in vitro*. Se han recuperado con éxito COCs de alpaca y llama con procedimientos menos invasivos y que no requieren de una cirugía, utilizando la aspiración folicular transvaginal y laparoscopia. Mediante la aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía, Brogliatti y col. (2000) alcanzaron una tasa de colección de COCs de 65% en llamas no estimuladas frente a un 52% en llamas estimuladas hormonalmente para la superovulación. Posteriormente estos resultados han sido mejorados por Ratto y col. (2005) quienes trabajaron con llamas del Centro de Investigación y Producción Quimsachata de la Estación Experimental ILLPA – INIA – Puno. Logrando recuperar 71% y 74% de COCs con 10,7 ± 2,1 y 11,2 ± 2,3 en promedio en llamas superovuladas con FSH y eCG respectivamente. En el Perú también se ha utilizado la técnica de aspiración folicular guiada por ultrasonido para recuperar COCs en alpacas. Gamarra y col. (2008) lograron recuperar en promedio 6 COCs/alpaca cuando el tratamiento para la sincronización y superovulación se hizo con 0,78 mg de progesterona + estradiol (Día = 0) y una dosis de 700 UI de eCG al momento del retiro de las esponjas con progesterona (Día = 7) y recuperaron 6,0 COCs en promedio por alpaca y cuando aplicaron otro tratamiento con LH (Día = 0) y eCG (Día = 2) recuperaron 6,1 COCs/alpaca. Los COCs de buena calidad fueron 7,4% y 64,9% con dispositivo intravaginal y sin este, respectivamente.

Después de haber realizado la recuperación de COCs se pusieron a madurar los ovocitos que tenían un cúmulus denso, según la categorización propuesta por De Losse y col. (1989). A continuación se pusieron a madurar por espacio de 24, 26, 48 y 72 h cada uno con 7 repeticiones en un medio de maduración compuesto por TCM-199 suplementado con 10% de FCS, 0,02 unid/ml de FSH + LH y 0.2 mM de piruvato de sodio 1 µg/ml de estradiol. En 24 h los ovocitos madurados tuvieron una media de 27,43, la misma media de ovocitos madurados se obtuvo a las 26 h, mientras que a las 48 h se obtuvo una media de 25 y a las 72 h se obtuvo una media de 23,71. Según los resultados obtenidos se puede deducir que el tiempo de maduración más adecuado oscila entre las 24 y 26 horas. Comparando con otros trabajos, para la maduración *in vitro* de ovocitos, se utilizan medios de cultivo clasificados por Gordon (1994). Estos se clasifican en medios simples y complejos. Un medio simple es aquel que contiene una Solución Salina Fisiológica tamponada usualmente con bicarbonato y adicionada de piruvato, lactato y glucosa. Un medio de maduración complejo contiene además de los constituyentes de un medio simple, aminoácidos, vitaminas, purinas y otras sustancias encontradas asociadas al suero sanguíneo. En camélidos se ha usado con éxito el Tissue Culture Medium - 199 (TCM-199) medio complejo compuesto por sales de Earle, con HEPES y bicarbonato, como estabilizadores de pH, y suplementado con piruvato, lactato, vitaminas, aminoácidos, proteína con suero fetal bovino (Palma, 2001).

En otro estudio, Ratto y col. (2005), utilizando un medio de maduración consistente de TCM-199 suplementado con piruvato de Na 0,2 mM, sulfato de gentamicina 25 µg/ml, FSH 0,5 µg/ml, estradiol 17-β 1µg/ml y suero fetal bovino al 10%, encontraron 77,7%, 80,6% y 80,4% de maduración cuando utilizaron 28, 30 y 36 h respectivamente, para la maduración *in vitro* de ovocitos de llama no encontrando diferencias estadísticas significativas entre los 3 tiempos evaluados. Por otro lado, Sansinema y col. (2003), para la maduración *in vitro* de ovocitos de llama incrementaron LH en su



protocolo de maduración, el medio de maduración que utilizaron estaba 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 maduros. Posteriormente el mismo grupo de investigación (Sansinena y col., 2007) utilizaron un medio un tanto diferente para la maduración *in vitro* de ovocitos de llama 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 1 µg/ml de estradiol 17β y 10% de suero fetal bovino, mejorando su anterior tasa de maduración con 74% de ovocitos en metafase II luego de 30 h de maduración *in vitro*.

En alpacas, Gómez y col. (2002) así como Ratto y col. (2007), han utilizado 26 h para la maduración *in vitro* de ovocitos recuperados por laparotomía ventral. Gómez obtuvo 46% y 40% de ovocitos en metafase II en alpacas donantes superovuladas con FSH y eCG, respectivamente. Ratto mejoró los resultados obtenidos por Gómez alcanzando 82% y 64% de ovocitos en metafase II para los mismos tratamientos superovulatorios en las alpacas donantes. Ruiz y Correa (2007) maduraron ovocitos de alpaca y llama durante 27 y 30 horas respectivamente en un medio compuesto por 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 tasas de 75% y 100% de maduración de ovocitos de llama y alpaca respectivamente por observación del primer corpúsculo polar. En este estudio se obtuvo 100% de maduración de los ovocitos de alpaca debido a que sólo 3 ovocitos fueron colocados a maduración *in vitro*, por lo que sería recomendable una mayor cantidad de ovocitos para obtener una real tasa de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca.

Luego de realizada la fertilización *in vitro* con semen fresco, habiéndose seleccionado los espermatozoides por el método Swin up, se obtuvo una tasa de segmentación de ovocitos en división 2 a las 24 h de 19,28%, a las 26 h un 21,86%, a 48 h de 1,86% y a las 72 h de 0,43. En relación a la tasa de segmentación, en ovocitos en división 4 a las 24 h se obtuvo un 14%, a 26 horas un 19%, a 48 h un 0,29% y a las 72 h no se obtuvo ningún resultado ya que estos fueron degenerándose. La tasa de segmentación de mórula a las 24 h se obtuvo un 4,86%, a 26 h un 9,57%, a 48 y 72 h no se obtuvo resultado alguno. De los resultados obtenidos anteriormente podemos deducir que el tiempo más adecuado de maduración *in vitro* para una buena fertilización *in vitro* se dio a las 26 h seguido de las 24 h. La tasa de blastocisto no se llegó a obtener en ninguno de los tiempos debido a que cuando llegaba a mórula comenzaba a degenerarse.

Haciendo comparaciones con otras investigaciones, Del Campo y col. (1995) indican que fecundaron *in vitro* ovocitos recuperados de alpacas superovuladas y los embriones de alpaca producidos desarrollaron hasta el estadio de blastocisto expandido. Del Campo y col. (1994), separaron epididimos de testículos de llamas beneficiadas, obtuvieron los espermatozoides por centrifugación en gradiente de Percoll y fecundaron ovocitos de hembras beneficiadas madurados *in vitro* logrando por primera vez en llamas el desarrollo de embriones producidos por FIV. En este trabajo recolectaron 1324 COCs de 98 ovarios de llamas beneficiadas, permitiéndoles disponer de gran cantidad de ovocitos para realizar diferentes tratamientos para la FIV, fijar ovocitos para evaluar el estado de maduración nuclear y describir el desarrollo embrionario producido después de la FIV. Un total de 234 ovocitos inseminados fueron co-cultivados en células epiteliales de oviducto de llama (LLOEC) previamente preparadas. 32% dividieron a las 48 h de evaluación y a los 9 días de evaluación 15,8% detuvo su desarrollo entre 2-16 células, 5,6% desarrollaron hasta mórulas, 6,0% entre blastocistos tempranos y expandidos y 4,7 blastocistos ecllosionados. Conde y col (2006), utilizaron un sistema similar para FIV en llamas, pero a diferencia con Del Campo y col (1994),

recuperaron los gametos de animales vivos, ya que es de esta manera en que la producción de embriones por FIV puede contribuir al mejoramiento genético recuperando gametos de animales de comprobada calidad genética. Los ovocitos fueron recuperados por punción folicular de ovarios expuestos por laparotomía lateral de hembras superovuladas y los espermatozoides fueron recuperados por electroeyaculación de llamas macho. El semen fue tratado con colagenasa para reducir su viscosidad. Los ovocitos aspirados fueron medidos y separados en 2 grupos: ovocitos colectados de folículos < 7mm y ovocitos colectados de folículos > 7mm. Los resultados de IVM fueron 29% y 78% para <7mm y > 7mm, respectivamente. Las tasas de división fueron 56% y 50% con y sin agentes capacitantes, también se reportaron 40,8% y 42,2% de división y 35% y 47% de blastocistos a los 8 días con y sin agentes capacitantes (heparina, penicilamina e hipotaurina), demostrando que la colagenasa no afecta la capacidad fecundante del semen y que es posible producir embriones de llama por FIV con semen fresco.

De los resultados obtenidos, se señala que no se dieron las condiciones necesarias, como es el caso de los medios que se utilizaron y esto nos lleva a pensar que hay que revisar las condiciones de cultivo a partir de la segmentación del segundo día, para intentar mejorar la tasa de desarrollo embrionario en alpacas. El otro problema que se tuvo es en la colecta de semen ya que este fue colectado mediante una vagina artificial horas antes de la fertilización, donde en la colecta de semen se observó un poco de contaminación de semen con polvo debido a que en el corral donde se encuentran las alpacas es de tierra y al momento de la colecta la alpaca que está en movimiento, hace que el semen se contamine con polvo, provocando en cierto modo menor viabilidad de espermatozoides.

Sin embargo en el Perú más de un grupo de investigadores viene trabajando en este camino. La importancia de lograr blastocistos radica en que es en este estadio de desarrollo en que los embriones pueden ser transferidos para lograr una preñez exitosa.

En Ayacucho es la primera prueba que se realiza en cuanto a la maduración y la fertilización *in vitro* de ovocitos demostrando que aquí también es posible producir embriones *in vitro* en alpacas y también en otro tipo de especies.

#### CONCLUSIONES

1. Para la producción *in vitro* de embriones de alpacas se obtuvo que en 24 y 26 h de maduración no tiene mucha diferencia significativa, mientras en 48 y 72 h no llegaron a desarrollarse y por ende se degeneraron.
2. El tiempo más adecuado de maduración de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones de alpacas fue de 26 horas seguido de 24 horas.
3. La tasa de segmentación en la producción *in vitro* de embriones de alpacas fue como sigue: ovocitos en división 2, a las 24 h en un 19,28%; a las 26 h en 21,86%, a las 48 h en 1,86% y a las 72 h en 0,43. La tasa de segmentación de ovocitos en división 4, a las 24 h se obtuvo un 14%, a las 26 h un 19%, a las 48 h un 0,29% y a las 72 h no se obtuvo ningún resultado ya que estos fueron degenerándose. La tasa de segmentación de mórula, a las 24 h se obtuvo un 4,86%, a 26 h un 9,57%, a 48 y 72 h no se obtuvo resultado alguno. No se llegó a obtener blastocisto alguno.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Apaza, N., Olarte, U. y Málaga, J. 1998. Empadre controlado de alpacas Huacaya en el Banco de Germoplasma de la E.E. ILLPA Puno. Memorias de la XXI Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Universidad Nacional del Altiplano. Puno-Perú.
2. Apaza, N., Sapaná, R., Huanca, T. y Huanca, W. 2001. Inseminación Artificial en alpacas con semen fresco en comunidades campesinas. Memorias de la XIV Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana

- de Producción Animal. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.
3. Brogliatti, M., Palasz, T., Rodríguez, H., Mapletoft, J. and Adams, P. 2000. Transvaginal collection and ultrastructure of llama (*Lama glama*) oocytes. *Theriogenology* (54): 1269-1279.
  4. Bustinza, V. 2001. La alpaca: conocimiento del gran potencial andino. Universidad Nacional del Altiplano. Puno-Perú
  5. Cárdenas, O., Huanca, T., Sapana, R. y Alarcón, V. 1999. Avances de inseminación artificial de llamas con semen congelado. XXII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Huancavelica-Perú.
  6. Conde, P., Herrera, C., Chaves, M., Giuliano, S., Director, A., Trasorras, V., Pinto, M., Carchi, M., Stivale, D., Rutter, B., Agüero, A., Miragaya, M. and Pasqualini, R. 2006. *In vitro* production of llama embryos by IVF or ICSI. *Reproduction, Fertility and Development* 19 (1): 237-238.
  7. Del Campo, M., Donoso, M. and Del Campo, C. 1992. *In vitro* maturation of Llama (*Lama glama*) oocytes. *Proc 12th Int Cong Anim Reprod*, (01): 324.
  8. Del Campo, M., Del Campo, C., Donoso, M., Berland, M. and Mapletoft, R. 1994. *In vitro* fertilization and development of Llama glama oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology* (41): 1219-1229.
  9. Del Campo, M., Del Campo C., Adams, G. and Mapletoft, R. 1995. The application of new reproductive technologies to South American Camelids. *Theriogenology* (43): 21-30.
  10. De Loose, F., Van Vliet, P., Van Maurik, P. and Kruij, T. 1989. Morphology of immature oocytes. *Gamete Res.* (24): 197-204.
  11. Fernández-Baca, S. 1991. Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Oficina regional de la FAO para América latina y el Caribe (1): 1-419.
  12. Fernández, S. 1993. Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. *Anim. Reprod. Sci.* (33): 307-323.
  13. Freshney, I. 1987. The culture environment. En: *Culture of animal cells, a manual of basic technique*. AR Liss, New York-USA.
  14. Fuladi, A., Waddington, D. and Campbell, K. 1998. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development *in vitro*: A comparative evaluation of antral follicle culture with other methods. *Biol. Reprod.* (50):390-400.
  15. Gamarra, G., Gallegos, A., Alvarado, E., Asparrin, M. and Vivanco, W. 2008. Techniques for ovum pick-up in gonadotropin-treated alpacas. *Reproduction, Fertility and Development* (20): 159-160.
  16. Gomez, G., Ratto, M., Berland, M., Wolter, M. and Adams, G. 2002. Superstimulatory response and oocyte collection in alpacas. *Theriogenology*. 57, (1): 584.
  17. Gordon, I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. CAB internacional, Cambridge-United Kingdom.
  18. Hafez, E., Hafez B. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. Ed. Hill Interamericana editores. México.
  19. Hoshi, H. 2003. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology* 50:675-685
  20. Lonergan, P., Monomaghan, P., Rizoz, A., Bolnad, M., and Gordon, I. 1994. The effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Mol Reprod. Dev.* (37): 48-53.
  21. Lonergan, P., Dinnyes, A., Fair, T., Yang, X. and Boland, M. 2005. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. *Mol. Reprod. Dev.* (57): 204-209.
  22. Marshall, V., Witon, L., and Moore, H. 1998. Parthenogenic activation of marmoset (*Callithrix jacchus*) oocytes and the development of marmoset parthenogenic activation of rhesus monkey oocytes and reconstructed embryos. *Biol. Reprod.* (59):1491-1497.
  23. Mitalipov, S., Nusser, K., and Wolf, D. 2001. Parthenogenic activation of resus monkey and reconstruted embryos. *Biol. Reprod.* (65):253-259.
  24. Palma, G. 2001. Biotecnología de la reproducción. Ed. NTA. Bariloche-Argentina.
  25. Pieterse, M., Kappen, K., Kruij, T. and Tarverme, M. 1987. Aspiration of bovine oocyte during transvaginal ultrasound scanning of the bovine ovaries. *Theriogenology* (30):751-762.
  26. Rath, D. 2001. Producción *in vitro* de embriones porcinos. En: "Biotecnología de la Reproducción". (Palma, G. Editor). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Bariloche-Argentina.
  27. Ratto, M., Wolter, M., Gómez C., Berland M. and Adams G. 1999. *In vitro* maturation of llama oocytes. En: "II Congreso Mundial sobre Camélidos". Cusco-Perú.
  28. Ratto, M., Berland, M., Huanca, W., Singh, J. and Adams, G. 2005. *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes. *Theriogenology* (63): 2445-2457.
  29. Ratto, M., Gómez, C., Berland, M. and Adams, G. 2007. Effect of ovarian superstimulation on COCs collection and maturation in alpacas. *Animal Reproduction Science* (97): 246-256.
  30. Ruiz, J. 2005. Comercialización de productos y subproductos de la explotación de camélidos sudamericanos. En: "IV Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Ruminantes y Camélidos Sudamericanos". Curitiba-Brasil.
  31. Ruiz, J. y Correa, J. 2007. Maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca y llama aspirados vía laparoscópica. En: "I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos". Huancavelica-Perú
  32. Ruiz, J., Correa, J., Ayuque, G., Landeo, L., Yaranga, M. y Zacarias, A. 2007. Producción *in vitro* de embriones partenogénicos de alpaca y llama. En: "I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos". Huancavelica-Perú.
  33. Saeki, K., Nacao, M., Hoshi, M. and Nagai, M. 1995. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation of bovine oocyte in a protein- free medium. *Theriogenology* 43:751-759.
  34. Sansinema, M., Taylor, S., Taylor, P., Denniston, R. and Godke, R. 2003. Production of nuclear transfer llama (*Lama glama*) Embryos from *in vitro* matured llama oocytes. *Cloning Stem cells* (5): 191-198.
  35. Sansinema, M., Taylos, S., Taylor, P., Schmidt, E., Denniston, R. and Godke, R. 2007. *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmatic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Animal Reproduction Science* (99): 342-353.
  36. Sumar, J. y Leyva, C. 1981. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*Lama pacos*). Memorias del IV convención internacional sobre camélidos sudamericanos. Punta Arenas - Chile.
  37. Wheeler, J. 1991. Origen, evolución y status actual. En: *Avances y Perspectivas de los Camélidos Sudamericanos*. Ed. Saúl Fernández-Baca. Oficina Regional de la FAO Para América Latina y el Caribe. Santiago - Chile.

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R.D Nº 154 – 2010

Bach: Raquel Ochante Pichardo

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro y diez de la tarde del día viernes 17 de setiembre del dos mil diez, se reunieron en le auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, bajo la presidencia del Mg. Pedro Ayala Gómez, encargado según memorando Nº 483–2010-UNSCH-FCB, quien representará al decano de la facultad; los miembros Mg. Fidel Mujica Lengua, Ing. Raúl Caballa León, Ing. Rogelio Sobero Ballardó, actuando como secretaria docente la Mg. Maricela López Sierralta, para recepcionar la sustentación de tesis: Evaluación del tiempo de maduración de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones de *Lama pacos* "alpaca". Ayacucho 2009, presentada por la Bachiller en Ciencias Biológicas Raquel Ochante Pichardo quien pretende optar título profesional de Bióloga en la Especialidad de Biotecnología.

El presidente encargado invita a la sustentante iniciar la exposición previa lectura de los documentos en mesa RD Nº 154-2010-FCB-D y Memorando Nº 483-2010-UNSCH-FCB, de lo cual dio lectura la Secretaria Docente.

Concluida la exposición el presidente (e) invita a los miembros del jurado calificador, realizar las observaciones y preguntas que crean pertinentes.

Concluida la ronda de preguntas el presidente invita a la sustentante y público en general abandonar el auditorio deliberación del jurado calificador y evaluación del trabajo de investigación, del cual se desprende lo siguiente:

Miembros del Jurado	Exposición	Resp. a preguntas	Promedio
Mg. Pedro Ayala Gómez	16	16	16
Mg. Fidel Mujica Lengua	16	16	16
Ing. Raúl Caballa León	16	14	15
Ing. Rogelio Sobero Ballardó	16	16	16
Promedio			16

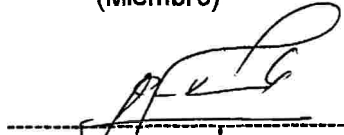
Como resultado de la calificación la sustentante obtuvo la calificación dieciséis (16) del cuál dan fe los jurados estampando su firma al pie del acta. Se concluyó el acto de sustentación siendo las cinco y cincuenta de la tarde.



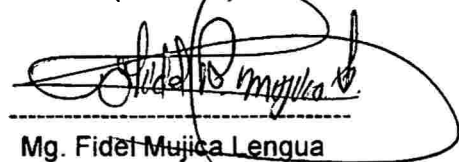
Ing. Rogelio Sobero Ballardó  
(Miembro)



Ing. Raúl Caballa León  
(Miembro)



Mg. Pedro Ayala Gómez  
Presidente (e)



Mg. Fidel Mujica Lengua  
(Miembro - Asesor)



Mg. Maricela López Sierralta  
Secretaria docente