

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE  
HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA**



**“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE EMBRIONES PRODUCIDOS  
POR FERTILIZACIÓN *IN VITRO* EN ALPACAS (*Vicugna pacos*)”**

**Tesis para obtener el Título Profesional de:  
MÉDICO VETERINARIO**

**PRESENTADO POR  
Bach. Contreras Huamaní, Mijaíl**

**ASESOR  
Mg. Sc. César Augusto Olaguivel Flores**

**AYACUCHO - PERÚ**

**2014**

## **DEDICATORIA**

En primer lugar a Dios, por iluminarme, ser mi guía y luz, por darme la fuerza necesaria y la capacidad para salir adelante.

A mis padres Mario y Antonia, por su esfuerzo, dedicación e indesmayable apoyo y comprensión, a mis hermanos y demás familiares por siempre confiar en mí, y a todos los que hicieron que este sueño sea hoy una realidad.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, mi Alma máter, por albergarme y brindarme conocimiento en mi formación profesional.

A la Facultad de Ciencias Agrarias y en especial a mi Escuela de Formación Profesional de Medicina Veterinaria y a toda la plana docente que contribuyeron en mi formación profesional.

Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Estación Experimental Agraria Canaán de Ayacucho por promover el desarrollo de la investigación.

Al Mg. Sc. César A. Olaguivel Flores, asesor de este trabajo de investigación, por su gran apoyo, valiosos consejos y sugerencias.

A la Ing. Mary Luz Naveros Flores, co-asesora de este trabajo de investigación, por su apoyo en la ejecución del trabajo de investigación y por todas las facilidades brindadas en la utilización de los Equipos, materiales disponibles en el laboratorio bajo su coordinación, por sus valiosos consejos, sugerencias, así como por su amistad y comprensión.

Al Dr. Sc. Teodosio Huanca Mamani, por su apoyo y valiosos consejos que me brindó.

Al M.V.Z. Rubén H. Mamani Cato, por su apoyo en el presente trabajo de investigación.

A los Biólogos Jenin Cortez P., Lariza Pahuara F., Ronal R., Edwin A. por su apoyo en la ejecución del presente trabajo de investigación.

## ÍNDICE GENERAL

	Págs.
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	2
Objetivo general:	
Objetivos específicos:	
I REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1. Antecedentes.....	3
1.2. Importancia de los Camélidos Sudamericanos .....	4
1.3. Ovulación en Camélidos Sudamericanos.....	5
1.4. Oogenesis.....	6
1.5. Factores importantes para la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos.....	7
1.5.1. pH y ambiente gaseoso.....	7
1.5.2. La Osmolaridad.....	7
1.5.3. Proteínas.....	7
1.5.4. Hormonas.....	8
1.6. Composición del fluido folicular en diferentes estadios de desarrollo.....	8
1.7. Obtención de ovarios.....	8
1.8. Recuperación de complejos ovocito cúmulo (COCs).....	9
1.9. Maduración <i>in vitro</i> .....	9
1.9.1. Expansión celular.....	11
1.9.2. Condiciones medio ambientales para la MIV de ovocitos.....	12
1.10. Preparación espermática para la fecundación <i>in vitro</i> .....	13
1.11. Fertilización <i>in vitro</i> .....	15
1.11.1. Reconocimiento y fusión de gametos.....	16
1.11.2. Medios para la fecundación.....	17
1.12. Cultivo de embriones.....	17
1.12.1. Desarrollo embrionario temprano.....	17
1.12.2. Estadio de desarrollo embrionario.....	18
1.13. Calidad embrionaria.....	20
1.14. Medios de cultivo.....	20
1.14.1. Suplemento de los medios de cultivo.....	20
1.14.2. Medio de cultivo SOF.....	23

II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
2.1. Lugar de ejecución.....	24
2.2. Duración.....	24
2.3. Población y muestra.....	24
2.4. Procedimiento experimental.....	25
2.5. Maduración <i>in vitro</i> .....	25
2.5.1. Preparación de medios.....	25
2.5.2. Obtención de ovarios y testículos.....	25
2.5.3. Recuperación y selección de ovocitos.....	26
2.5.4. Maduración de ovocitos.....	26
2.5.5. Fertilización <i>in vitro</i> (FIV).....	27
2.5.5.1. Recuperación y selección de espermatozoide.....	27
2.5.5.1.1 Técnica de Percoll para selección de espermatozoides.....	27
2.5.5.1.2. Técnica de Swim up.....	27
2.5.6. Cultivo de embriones.....	28
2.5.7. Clasificación de embriones.....	28
2.5.8. Diseño estadístico.....	28
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
IV. CONCLUSIONES.....	37
V. RECOMENDACIONES.....	38
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	39
VII. ANEXOS.....	45

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 01: Valoración morfológica según IETS.....	19
Cuadro N° 02: Escala de clasificación embrionaria de IETS, 1998.....	28
Cuadro N° 03: Promedio de ovocitos por ovario.....	30
Cuadro N° 04: Categorización de ovocitos de alpaca.....	31
Cuadro N° 05: Porcentaje de ovocitos por ovario, según tratamiento.....	32
Cuadro N° 06: Porcentaje de ovocitos fertilizados, según tratamiento.....	32
Cuadro N° 07: Porcentaje de mórulas según calidad obtenidas.....	33
Cuadro N° 08: Porcentaje de Blastocistos según calidades obtenidas.....	34
Cuadro N° 09: Número y porcentaje de mórulas y blastocistos, según calidad.....	35
Cuadro N° 10: Porcentaje total de embriones obtenidos según calidad.....	35
Cuadro N° 11: Clasificación de ovocitos de Alpacas.....	48
Cuadro N° 12: Clasificación de CCOs de Bovinos.....	48
Cuadro N° 13: Preparación de la solución salina fisiológica 0.9%.....	49
Cuadro N° 14: Medio de Manipulación.....	49
Cuadro N° 15: Medio de Maduración.....	49
Cuadro N° 16: Medio de Fertilización.....	50
Cuadro N° 17: Medio cultivo SOF.....	50
Cuadro N° 18: Glutamina.....	50
Cuadro N° 19: Piruvato.....	50
Cuadro N° 20: Myoinositol.....	50
Cuadro N° 21: Fb-Estradiol.....	50
Cuadro N° 22: Ácido Cítrico.....	51
Cuadro N° 23: FSH-LH.....	51
Cuadro N° 24: Aceite Mineral.....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Gráfico N° 01: Valoración de expansión del cúmulo.....	12
Gráfico N° 02: Eventos que sufre el espermatozoide hasta la fusión con el ovocito.....	14
Gráfico N° 03: Secuencia de eventos básicos de la fecundación en mamíferos.....	16
Gráfico N° 04: Clasificación de embriones según IETS.....	19
Gráfico N° 05: Secuencia de la producción <i>in vitro</i> .....	25
Gráfico N° 06: Clasificación de ovocitos (Mellisho, 2010).....	49
Gráfico N° 07. Categorización morfológica de ovocitos.....	51
Gráfico N° 08: Porcentaje de mórulas obtenidas según calidad.....	52
Gráfico N° 09: Porcentaje de blastocisto según calidad.....	52
Gráfico N° 10: Porcentaje total de mórulas y blastocisto según calidad.....	53
Gráfico N° 11: Porcentaje total de embriones según calidad.....	53
Gráfico N° 12. Flujo de la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos.....	54
Gráfico N° 13: Flujo de la fertilización <i>in vitro</i> de ovocitos según Percoll.....	55
Gráfico N° 14: Flujo de la fertilización <i>in vitro</i> de ovocitos según Swim up.....	56
Gráfico N° 15: Flujo de cultivo <i>in vitro</i> de cigotos.....	57

## ABREVIATURAS

AMPe.....	Adenosina monofosfato-3',5'-cíclico
BSA.....	Albumina sérica bovina.
COC/COCs.....	Complejo ovocito-cúmulus
EGF.....	Factor de crecimiento epidérmico
FIV.....	Fertilización <i>in vitro</i>
FSH.....	Hormona folículo estimulante.
FGF.....	Factor de crecimiento fibroblástico.
FCS/SFB.....	Suero fetal bovino
FIO.....	Factor inductor de ovulación.
HEPES.....	N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-ácido etanolsulfónico
hCG.....	Hormona Gonadotropina Coriónica Humana.
IGF-I.....	Factor de crecimiento similar a la insulina-I.
IGF-II.....	Factor de crecimiento similar a la insulina-II.
IETS.....	Sociedad internacional de transferencia de embriones.
IGF.....	Factor de crecimiento insulínico
LH.....	Hormona luteinizante.
MII.....	Metafase II
MIV.....	Maduración <i>in vitro</i>
NGF.....	Factor de crecimiento nervioso
PIV.....	Producción <i>in vitro</i> de embriones
SOF.....	Fluido oviductal sintético.
SVC.....	Suero de vaca en celo
TALP -Fiv.....	Medio Tyrode's albumina lactato piruvato Modificado
TL.....	Tyrode's lactato
TGF.....	Factor Crecimiento Transformante
TCM-199.....	Medio de cultivo de tejidos 199.
TGF- $\beta$ .....	Factor de crecimiento transformante $\beta$ .
TNF- $\alpha$ .....	Factor de necrosis tumoral $\alpha$ .
VG.....	Vesícula germinal



## RESUMEN

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria INIA-CANAAN- AYACUCHO, ubicado en el Andrés Avelino Cáceres, Provincia de Huamanga, Departamento de Ayacucho, el objetivo fue evaluar la calidad de embriones producidos a partir de la fertilización *in vitro* en alpacas (*Vicugna pacos*). Los ovarios fueron recolectados del Camal Municipal de Pilpichaca y trasladados en solución fisiológica al 0.9% más antibiótico (gentamicina) 1 ml/1L de Solución a una temperatura de 37°C. Una vez llegado al laboratorio se realizó la aspiración recuperando 1137 ovocitos de un total de 370 ovarios, equivalente a un promedio de 7.2 ovocitos /alpaca. Luego se realizó la selección de los ovocitos de categoría I y II y la maduración *in vitro* por un tiempo de 32 horas a una temperatura 38.5°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 90 % de humedad, pasada esta hora se realizó la fertilización *in vitro* con semen recuperado de epidídimo de alpacas post mortem, los cuales fueron capacitados y seleccionados por dos métodos, gradiente de Percoll y Swim up. Obteniendo un promedio de ovocitos a la fertilización de  $97.72 \pm 2.86$  y  $96.00 \pm 2.27$  respectivamente, el tiempo para la fertilización fue de 18 horas en promedio a una temperatura 38.5°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 90 % de humedad transcurrido este tiempo los presuntos cigotos fueron lavados y transferidos al medio de cultivo e incubados por 7 días a 38.5°C en una atmósfera de aire estéril con 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 90 % de humedad. En los resultados obtenidos se observa que el porcentaje de mórulas utilizando el método Percoll las calidades: excelente, buena, mediana y mala fueron: 21.88, 51.56, 20.31 y 6.25% respectivamente, el porcentaje de mórulas utilizando el método Swim up las calidades de excelente, buena, mediana y mala fueron de 27.27, 56.82, 9.09 y 6.82% respectivamente. El porcentaje de blastocistos obtenidos utilizando Percoll las calidades: Excelente, buena, mediana y mala fueron: 34.64, 36.36, 18.18 y 6.82% respectivamente, el porcentaje de blastocistos utilizando Swim up las calidades: excelente, buena, mediana y mala fueron de 25.00, 66.67, 8.33 y 0.00% respectivamente. La calidad de embriones producidos por fertilización *in vitro* fueron de excelente, buena, mediana, mala e intransferible: 5,35; 9,53; 3,02; 1,16 y 80, 93% respectivamente. Se concluye que por medio de la fertilización *in vitro* en alpacas se puede obtener embriones de excelente, buena y mediana calidad.

**Palabras claves:** FIV, Embriones, Percoll, Swim up, Mórula, Blastocisto.

## INTRODUCCIÓN

La alpaca (*vicugna 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 msnm. En el Perú, los camélidos sudamericanos probablemente constituyen el único medio de utilización productiva de las extensas áreas de pastos naturales de zonas alto andinas donde no es posible la agricultura ni la crianza económica de otras especies de animales domésticos. Estos animales convierten con inusual eficiencia, los pastos pobres de estas alturas en productos de alta calidad como son la fibra y la carne.

En la Región de Ayacucho los alpaqueros de las comunidades campesinas requieren mejorar la calidad genética de sus animales con el objetivo de incrementar los índices de productividad de fibra y de carne, de allí su demanda en contar con alternativas tecnológicas en biotecnología reproductiva para hacer de su crianza una actividad competitiva y rentable, para ello la fertilización *in vitro* podría apoyar con el avance en el mejoramiento genético del sector alpaquero.

La Fertilización *in vitro* (FIV) es una metodología realizada en laboratorio, donde el ovocito maduro se expone a espermatozoides previamente capacitados para que se produzca la fecundación proporcionando las condiciones óptimas que simulen lo que ocurre de forma natural. La FIV tiene como propósito producir embriones, llevarlos a estadios avanzados para posteriormente ser clasificadas, evaluadas y transferidos a una hembra receptora (Quintana y col., 2012).

Esta técnica de fertilización *in vitro* involucra cuatro procesos, la obtención de ovocitos, maduración *in vitro*, fertilización *in vitro* y cultivo *in vitro* de cigotos para su posterior desarrollo.

De acuerdo a las normas del IETS “Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones” el código para clasificar la calidad embrionaria está basada en la integridad morfológica de los embriones, ya que embriones de calidad excelente y buena pueden ser utilizadas para la transferencia de embriones.

Por tanto el objetivo del presente trabajo fue:

- Evaluar la calidad de embriones producidos a partir de la fertilización *in vitro* en alpacas (*Vicugna pacos*).

Los objetivos específicos fueron:

- Evaluar los ovocitos para el proceso de maduración en la fertilización *in vitro* a partir de ovarios procedentes de alpacas beneficiadas en camal.
- Evaluar y clasificar los embriones producidos por fertilización *in vitro* a partir de ovarios procedentes de alpacas beneficiadas en camal.
- Evaluar la calidad de embriones por dos métodos de capacitación de espermatozoides en la fertilización *in vitro* en alpacas

## CAPÍTULO I

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 1.1. Antecedentes

En Camélidos existe escasa información referida a la colección de ovocitos de ovarios de alpacas beneficiadas y madurados *in vitro*. Un estudio realizado con ovocitos obtenidos de ovarios de camal y madurados a 38 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, en los que se utilizaron medios de maduración de uso en bovinos, reporta una alta tasa de ovocitos en MII. (62 %) a las 32 horas de incubación (Del Campo y Col., 1992).

En Perú, también existen reportes sobre fecundación *in vitro* en alpacas (Gamarra y Col., 2008, Mendoza y Col., 2008).

La obtención de ovocitos puede ser realizada de ovarios procedentes de alpacas beneficiadas en camal o por aspiración trans-vaginal. En el primer caso, los camales no siempre se encuentran cerca a los laboratorio, por lo que en una primera fase se evaluaron las diferencias en la calidad de ovocitos obtenidos de ovarios de alpacas y transportados desde el matadero, bajo dos diferentes temperaturas (4° y 35 ° C), los resultados sugieren una mejor calidad de los ovocitos procedentes de ovarios transportados a 35 °C, respecto a los 4°C (Huanca y Col., 2007).

Por otro lado compararon los métodos de gradientes de Percoll y Swim up para la recuperación de espermatozoides epididimarios para utilizarlos en la fertilización *in vitro* de ovocitos de alpacas aspirados de ovarios obtenidos en el camal. Los epidídimos fueron separados de los testículos y ordeñados sobre Sperm – TALP, posteriormente fueron centrifugados en Sperm – TALP y finalmente sometidos a uno de los dos tratamientos siguientes: centrifugados en una gradiente de Percoll o colocados en la estufa por 45 – 60 minutos en una inclinación de 45°. Los ovocitos previamente colocados en Fert – TALP fueron inseminados con una concentración final aproximada de 2.5 – 3.5 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml. Los resultados que se obtuvieron fueron 36,0% y 43,9% de

segmentación, y 6,3 y 6,9% de blastocisto para Percoll y Swim up respectivamente, demostrando que es posible utilizar el método de Swim up en la FIV de ovocitos de alpaca (Mendoza y Col., 2008).

Se congelaron espermatozoides epididimarios previamente diluidos en una solución de TRIS – fructuosa con 10% de glicerol. Los pelets conteniendo los espermatozoides fueron descongelados y centrifugados en una gradiente de Percoll y resuspendidos en medio Fert - TALP suplementado con penicilamina, hipotaurina, epinefrina y heparina. Los ovocitos madurados *in vitro* fueron inseminados con una concentración de  $10 \times 10^6$  espermatozoides de 100 ml de Fer-TALP. Obtuvieron a los 5 días 8,0% de mórulas y blastocistos y a los 7 días de cultivo embrionario 3 % de blastocistos eclosionados (Gamarra y Col., 2008).

Estudios sobre el efecto de la atmósfera sobre el desarrollo de embriones de alpacas producidos por fecundación *in vitro*. Se utilizaron 400 ovocitos aspirados desde ovarios de alpacas beneficiadas, los cuales fueron madurados *in vitro* por 25 horas en medio de maduración suplementado con suero fetal bovino (SFB), sulfato de gentamicina, estradiol, FSH y Piruvato de Na. Finalizado el periodo de maduración, los ovocitos maduros fueron colocados en gotas de 50 ul de Fert-TALP suplementado con 3 mg/ml BSA, 10% de sulfato de gentamicina y 10% de piruvato de Na y fueron fecundados con 10 ul de espermatozoides epididimarios recuperados por el método de Swin up. Después de 18 horas de fecundación los posibles embriones fueron transferidos a gotas de 50 ul de medio de cultivo SOF-IVC suplementado con 3 mg/ml de BSA. Un grupo de 200 ovocitos fecundados fueron cultivados en atmósfera de cultivo con 5% de CO<sub>2</sub> y otro grupo de 200 ovocitos fecundados fueron cultivados en una atmósfera con 90% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y 5% O<sub>2</sub> por un periodo de 8 días. Los resultados para los embriones cultivados en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> fueron: 86,36%, 78,26% y 10,04%; y para los embriones cultivados en una atmósfera con 90% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y 5% O<sub>2</sub> fueron: 91,28%, 86,11% y 11,22% de división, mórula y blastocistos respectivamente; sin diferencias estadísticas significativas entre ambas atmósferas de cultivo (Elizabeth H. y Col., 2011).

## **1.2. Importancia de los camélidos sudamericanos**

La población de alpacas en el Perú es de 3 685,5 superando en 50,2% a la encontrada en el censo agropecuario de 1994. La raza Huacaya concentra el 80,4% de la distribución, seguida de la raza Suri con 12,2% y Cruzados con 7,3% (INEI, 2012), 1'300.920 llamas y 188.327 vicuñas, el Departamento de Ayacucho tiene una población de 230 910 alpacas, cuyas

poblaciones están distribuidas por la región alto andina en altitudes superiores los 4.000 metros sobre el nivel del mar. La crianza de estas especies constituye la actividad principal de 350.000 familias campesinas de la zona alto andina, ya que, en esta región, la agricultura es tan sólo una actividad complementaria. Sin embargo, estos ganaderos continúan utilizando sistemas de manejo tradicionales, lo que dificulta la obtención de unos resultados productivos competitivos. Así, a pesar de que el Perú alberga al 80% de la población mundial de alpacas, la repercusión en la economía peruana de los productos obtenidos a partir de estos camélidos es muy poco significativa. No obstante, en los últimos años se ha producido un acelerado desarrollo de una industria textil artesanal, generada por algunas ONGs y para satisfacer las demandas del turismo, que crea numerosos puestos de trabajo al utilizar métodos artesanales para el hilado y tejido (Sumar, 2007).

### **1.3. Ovulación en camélidos sudamericanos**

Los camélidos, como especies de ovulación inducida, requieren del estímulo de la cópula para ovular (San Martín y Col., 1968). Sin embargo, las hormonas (Novoa, 1991) y factores apropiados como los físicos, auditivos, olfatorios o visuales, también pueden provocar la ovulación. Además, según ha sido determinada recientemente, un factor inductor de ovulación (FIO) presente en el plasma seminal de estas especies puede inducir la ovulación (Adams, 2005). En camélidos sudamericanos, es la estimulación producida por el coito y no el incremento de estrógenos, la que inicia el proceso de descarga de LH (Novoa y Leyva, 1996).

Es así que las concentraciones de estradiol no varían durante las 18 horas posteriores a la cópula, tienden a declinar a las 22 horas y son significativamente menores alrededor de las 48 horas después de la cópula (Bravo, 1997).

La elevación de los perfiles de estradiol en las hembras con folículos mayores a los 7 mm no parece ser suficiente, por si sola, para estimular la descarga pre ovulatoria de Hormona Luteinizante (LH) como ocurre en las especies de ovulación espontánea, por lo que requiere de estímulos adicionales como el FIO. Por otro lado la LH permanece elevada en llamas ( $2,6 \pm 0,6 \mu\text{g/L}$ ) inmediatamente después de la monta (Aba *et al*, 1995); al igual que las concentraciones de prostaglandina en llamas ( $709 \pm 60 \text{ pmol/L}$ ) y en alpacas ( $30 \text{ pmol /L}$ ). El pico de surgimiento preovulatorio de LH se observó a las 2 horas; hallándose valores basales 7 horas post-cópula (Milligan, 1982).

#### **1.4. Oogénesis.**

El ovario es el órgano femenino que tiene como fin último la reproducción mediante dos funciones: la endocrina produciendo hormonas que ejercen su acción en este y en otros órganos, y la generación de células germinales. En la región cortical del ovario se localizan los folículos que constituyen la unidad funcional por excelencia del ovario y que se encuentra en estadio de folículos primordiales, sin signos aparentes de diferenciación, o con folículos en la fase de reclutamiento o maduración (Mehlmann y Col., 2002).

Durante el desarrollo fetal las células germinales primordiales del ovario van a sufrir un proceso de diferenciación; inicialmente se transforma en ovogonias por sucesivas divisiones mitóticas, las cuales dan lugar a ovocitos primarios al iniciarse la primera división mitótica. En las hembras, toda la población de ovocitos entra en la meiosis sincrónicamente en la vida fetal. Justo antes o poco después del nacimiento se produce la primera detención de la meiosis en el estadio de diploteno de la pro fase I (estadio dictiatio). En este momento el ovocito es rodeado por células granulosas que forman una membrana basal alrededor de las mismas, generando el comportamiento folicular (Mehlmann y Col., 2002). La primera parada de la meiosis se mantiene hasta momentos antes de la ovulación o de la atresia folicular (Van de Wil y Col., 1983), y es necesario para asegurar que el ovocito disponga de tiempo suficiente para crecer antes de la fecundación.

La latencia del ovocito en estadio de diploteno de la profase I se mantiene debido a un sistema de control múltiple en el que están implicados factores como el AMP cíclico (AMPc) (Conti y Col., 2002), la hipoxantina y el factor inhibidor de la maduración de ovocitos, cuya finalidad es mantener inactivo el factor promotor de la maduración/meiosis (MPF) (Kalinowski y Col., 2004).

Los ovocitos en estado latente en la profase I, presenta un núcleo prominente denominado vesícula germinal (VG) y está rodeados de una capa de células epiteliales (foliculares) no proliferativas conocidas como células pre granulosas, que están implicadas en el crecimiento folicular y en el mantenimiento de la inhibición de la meiosis del ovocito. El conjunto de ovocito primordial y la capa de células de la granulosa forman una unidad funcional denominada folículo primordial (Gougeon, 1996). En el momento del nacimiento la mayoría de los ovocitos han alcanzado este estado y se encuentran formando los folículos primordiales, siendo la única fuente de gametos femeninos en el animal sexualmente maduro (Gougeon, 1996).

## **1.5. 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 (Freshney, 1987).

### **1.5.1. 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 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 se acercaría 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).

### **1.5.2. 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).

### **1.5.3. 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 éstos aportan, nutrientes vitaminas, factores de crecimiento, hormonas y compuestos antioxidantes en concentraciones variables. Aunque existen cultivos celulares que requieren suero, existen



evidencias suficientes, que los ovocitos pueden ser madurados sin la presencia de suero en el medio (Hoshi, 2003).

#### **1.5.4. 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).

#### **1.6. Composición del fluido folicular de alpaca en diferentes estadios de desarrollo**

El conocimiento de la composición bioquímica de los líquidos corporales, en especial los del tracto reproductivo, indicaría las necesidades nutricionales de los gametos, de acuerdo al lugar donde se encuentran; dichos componentes podrían ser utilizados para la formulación de medios de cultivo (Salisbury y Col., 1978). La fisiología ovárica es particular en los camélidos, en los cuales se presentan ciclos foliculares de 12 días en promedio, lo que junto a la alternancia ovárica, hace que la alpaca hembra se encuentre constantemente receptiva (Bravo, 1990). La presencia del fluido folicular en muchas especies es importante en la fisiología ovárica, pues las concentraciones de proteínas, esteroides, carbohidratos y mucopolisacáridos no son constantes a través del crecimiento folicular (Gibory y Millar, 1982); la composición del fluido cambia a medida que crece el folículo (Illera, 1994). La composición química del fluido de los folículos dominantes actúa de indicador de la calidad y estadio de desarrollo del ovocito, mediante la presencia de sustancias del metabolismo celular; provee indicaciones de requerimientos celulares y puede ser usada como una guía en la formulación de medios condicionados de cultivo celular (Gerard y Col., 2002).

#### **1.7. Obtención de ovarios**

Se consigue de alpacas sacrificadas en camales. Todos los autores están de acuerdo en que la obtención debe realizarse inmediatamente después de la muerte del animal, siendo habitual hacerlo dentro de los 30 minutos siguientes al sacrificio (Ruiz y Col., 2007; Mendoza y Col., 2008; Gamarra y Col., 2008; Fernández y Esteban, 2009; Ruiz., 2009).

El transporte se hace en soluciones salinas fisiológicas (SSF) o buffer fosfato salinas (PBS) con antibiótico (Rato y Col., 2005; Huanca y Col., 2007).

## **1.8. Recuperación de complejos ovocito cúmulo (COCs)**

Distintas metodologías se han evaluado para la recuperación de complejos ovocitocúmulus (COCs) en camélidos sudamericanos. Ovarios de alpacas y llamas obtenidos de hembras beneficiadas en el camal son una fuente adecuada para la recuperación de COCs, facilitando una gran disponibilidad de ovocitos para la investigación en la estandarización de protocolos de maduración y/o fertilización *in vitro*, y para su utilización como receptoras de núcleos de células donadoras en un programa de transferencia nuclear (clonación). De este modo lograron recuperar 27 COCs por llama, desmenuzando los ovarios con ayuda de un hoja de afeitar descartando 26% de los 1324 COCs recuperados (Del Campo y Col., 1994).

También se han recuperado COCs de llama (Del campo y Col., 1992), puncionando folículos de ovarios (previamente lavados en una solución salina al 0,9%) con ayuda de una jeringa manual, con esta metodología (Del campo y Col., 1992) recuperaron 6.4 ovocitos por llama y (Ratto y Col, 2005) 2,2 COCs/ovario con 95% (308/324) seleccionados como aptos para el cultivo *in vitro* en medio de maduración utilizando ovarios de animales beneficiados, los folículos se aspiraron con agujas 21G y jeringa estéril de 5 cc, 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* (Ruiz, 2009). Los COC's se clasificarán como:

- ✓ Viables (calidad I y II)
- ✓ No viables (calidad III y IV), para los procesos de maduración y fecundación *in vitro*. La clasificación de ovocitos de alpaca y COCs de bovinos se muestran en el (Anexo 02, cuadro 11, 12 Gráfico N° 06).

## **1.9. Maduración *in vitro***

Los COCs recuperados requieren de un proceso de maduración artificial en el laboratorio antes de utilizarlos en la producción *in vitro* de embriones. La maduración *in vitro* simula el tiempo transcurrido y sobretodo los procesos metabólicos que en forma natural ocurren en el ovocito contenido en el folículo dominante, entre el pico preovulatorio de LH hasta que se produce la ovulación. En este proceso se reactiva la división meiótica, desde el estado de diploteno de la profase I de la primera división hasta alcanzar la metafase II de la segunda división meiótica, momento en que el ovocito ovula de forma natural. El ovocito se mantiene en este estado hasta que es fecundado por un espermatozoide o activado artificialmente para producir embriones por partenogénesis, por inyección intracitoplasmática de

espermatozoides (ICSI). Para la maduración *in vitro* de ovocitos, se utilizan medios de cultivo clasificados en medios simples y medios complejos (Gordon, 1994).

Un medio simple es aquél 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 bovinos el medio tradicional y exitosamente usado es el Tissue Culture Médium 199 (TCM 199) medio complejo, compuesto por sales Earles con Hepes y bicarbonato, como estabilizadores de pH y suplementado con piruvato, lactato y vitaminas aminoácidos, purinas y proteínas como suero fetal bovino o albúmina sérica bovina (Rath, 2001). *In vivo*, la maduración de COCs de alpaca y llama se ha estimado calculando el tiempo que transcurre desde la cópula hasta la ovulación. Así, en alpacas el tiempo mínimo de ovulación fue estimado 26 horas después de la monta natural y 24 horas después del tratamiento con hCG (San Martín y Col., 1968). Los procedimientos de maduración *in vitro* permiten obtener ovocitos maduros sin la necesidad de recurrir a la estimulación ovárica con gonadotrofinas. Esta técnica implica la extracción de los complejos cúmulo-ovocito de los folículos antrales y su posterior cultivo hasta que alcanzan la metafase II. Cuando las condiciones de cultivo utilizadas durante esta etapa son muy desfavorables se alteran tanto la maduración nuclear como la citoplásmica, lo que impide que se produzca la fecundación. Sin embargo, cuando el sistema empleado tiene pequeñas deficiencias sus efectos no se manifiestan hasta el inicio del desarrollo embrionario temprano y en algunos casos solamente son apreciables con claridad después de la implantación. (San Martín y Col., 1968).

En la mayor parte de las especies analizadas, se ha comprobado que los ovocitos madurados *in vitro* tienen menor competencia para el desarrollo que los madurados *in vivo* (Farin y Col, 2001; Yang y Col, 2001; Combelles y Col., 2002).

Este hallazgo puede ser fácilmente explicado por las grandes diferencias existentes entre ambos procesos. Cuando se realiza la maduración *in vitro* los CCO se obtienen a partir de folículos antrales con un diámetro de 4 a 8 mm, por lo que los ovocitos no han completado la etapa final de maduración intrafolicular y por tanto no han adquirido su plena competencia para el desarrollo. Además, el reinicio espontáneo de la meiosis, como respuesta de la extracción de los ovocitos de su ambiente folicular, supone la activación de sistemas de control diferentes a los que intervienen tras la descarga preovulatoria de LH (Gilchrist y Thompson, 2007).

Durante la maduración *in vivo* los ovocitos permanecen de 4 a 5 días en el interior de un folículo antral, que es el tiempo que tarda en incrementarse el diámetro folicular desde los 4 a los 15 mm. Por el contrario, los ovocitos utilizados para la maduración *in vitro* se obtienen a partir de folículos de 4 a 8 mm, lo que determina que no se haya completado esta maduración final. Este hecho repercute en el porcentaje de blastocistos obtenidos *in vitro* (Lonergan y Col., 2003). Así, se ha comprobado que los ovocitos procedentes de los folículos de mayor tamaño (>6 mm), tienen más probabilidades de producir blastocistos, que los obtenidos de folículos de menores dimensiones (Iwata y Col., 2004).

Tal y como hemos señalado previamente, la maduración del ovocito es un proceso largo y complejo que comprende la maduración nuclear, citoplásmica y molecular. Estos procesos pueden producirse de manera independiente, pero solamente permitirán la adquisición de la competencia para el desarrollo cuando se desarrollen de manera sincronizada.

En la mayor parte de los mamíferos el ovocito se encuentra en metafase II en el momento de la ovulación, situación en la que permanecerá hasta la entrada del espermatozoide o la activación partenogénica (segundo bloqueo de la meiosis). El bloqueo en metafase II es consecuencia de la actuación de un factor citostático (CSF) (Masui, 1990).

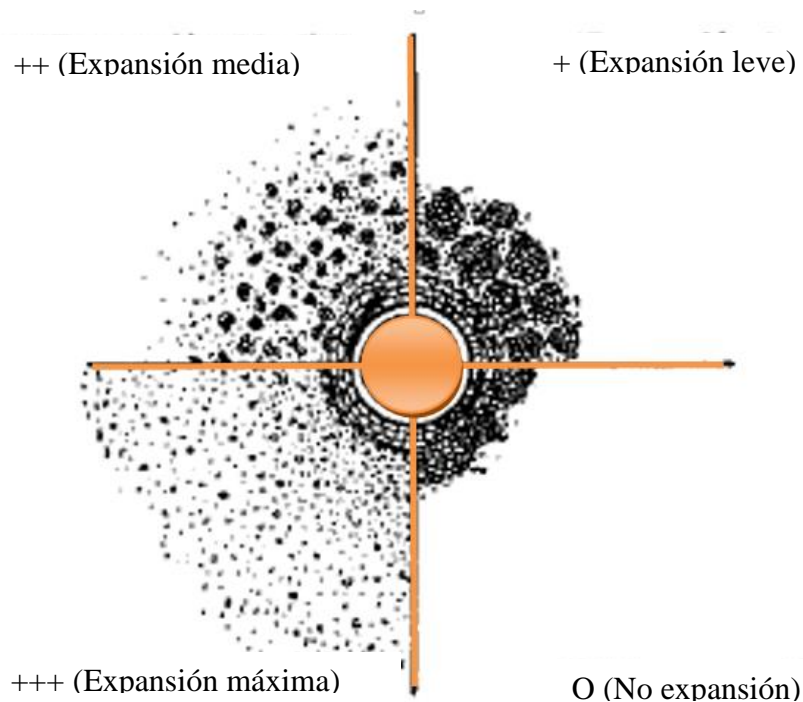
Cuando el espermatozoide penetra en el citoplasma del ovocito se completa la segunda división meiótica y se produce la expulsión del segundo corpúsculo polar (Anderson, 1991).

### **1.9.1. Expansión del cúmulo celular**

Criterio de expansión del cúmulo es el siguiente

-Expansión nula. No existe expansión adecuada del cumulo

1. Pequeña expansión de aproximadamente un diámetro del oocito
2. Expansión apreciable, de unos dos diámetros del oocito
3. Expansión máxima, de más de tres diámetros del oocito, e incluso de las células de la corona radiada



**Gráfico N° 01:** Valoración de expansión del cúmulo (Whittingham, 1979).

### 1.9.2. Condiciones medioambientales para la maduración *in vitro* de los ovocitos

A efectos de optimizar la maduración *in vitro*, es importante proveer al ovocito del medio ambiente adecuado que le permita generar los procesos biológicos necesarios (temperatura, presión osmótica, pH y atmósfera del incubador) para completar la maduración nuclear y citoplasmática (Mochizuki y Col., 1991; Rose y Bavister, 1992).

La temperatura más adecuada para el cultivo *in vitro* de los ovocitos bovinos es de 39°C (Lenz y Col., 1983; Leibfried-Rutledge y Col., 1989; Rose y Bavister, 1992).

Lenz y Col. (1983) informan que las temperaturas comprendidas entre 37°C y 41°C no perjudican con el proceso de maduración *in vitro* de los ovocitos. Del mismo modo, un estudio realizado por Shi y Cols. (1998) donde la temperatura de cultivo *in vitro* de ovocitos es modificada entre valores de 37°C y 38.5°C, estos autores observan que los cambios térmicos no producen efectos adversos durante la maduración *in vitro* de los ovocitos y el posterior desarrollo embrionario. Sin embargo, los cultivos *in vitro* de ovocitos realizados 5°C por debajo de las temperaturas antes mencionadas, no han llevado a buen término la maduración de los ovocitos (Katska y Smorag, 1985).

La presión osmótica que deben tener los medios de maduración de ovocitos, oscila idealmente entre 265 y 325 mOsM. Los medios generalmente utilizados tienen osmolaridades cuyos valores oscilan entre 285 y 295 mOsM (Sato y Col., 1977; Del Campo y Col., 1992).

Diversos autores han establecido que el pH óptimo en el medio de maduración debe mantenerse entre 7.2 y 7.4 (Shea y Col., 1976; Sato y Col., 1977; Fukui y Sakuma, 1980). El control del pH en el medio de maduración se realiza gracias a la concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera del incubador, bicarbonato de sodio en el medio, u otro tipo de sustancias tampón adicionadas al medio de cultivo como las sales de Hepes (Lu Col., 1987). La composición de la atmósfera gaseosa en el incubador, se considera importante, en el control del pH intra y extracelular y por ende las funciones metabólicas de las células en cultivo (Bavister, 1987). Por ello habitualmente se emplean mezclas de gases a diferentes concentraciones 5% de CO<sub>2</sub> en el aire, o bien, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 90% N<sub>2</sub> (Fukui y Col., 1982; Lu y Col., 1987; Younis y Col., 1989).

### **1.10. Preparación espermática para fecundación *in vitro***

Para lograr la fecundación *in vitro* es necesario una preparación previa de los espermatozoides y de los ovocitos, y posteriormente cultivar conjuntamente ambos gametos en unas condiciones apropiadas para que se mantenga su actividad metabólica.

#### **1.10.1. Preparación de los espermatozoides.**

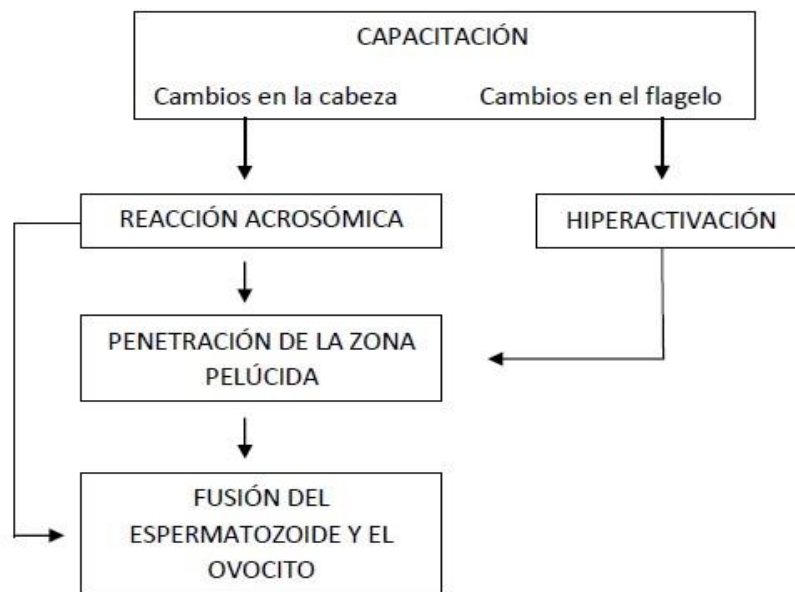
Las técnicas más empleadas para la selección de los espermatozoides, en la actualidad, son el “Swim-up” (Parrish y Col., 1986) y la centrifugación a través de un gradiente discontinuo de Percoll (Saeki y Col., 1995).

La centrifugación en gradiente de Percoll se realiza con mayor rapidez y permite recuperar un mayor número de espermatozoides (Avery y Greve, 1995).

Los espermatozoides son separados en función de su densidad. Así, los espermatozoides cuya morfología nuclear es normal son los más densos, por lo que se depositan en la fracción más rica en Percoll (Iritani, 1991), mientras que los espermatozoides muertos o degenerados, el plasma seminal y el diluyente permanecen en la fracción menos densa (Avery y Greve, 1995). No encontrando diferencias significativas con respecto a los porcentajes de cigotos divididos cuando compararon los resultados obtenidos utilizando espermatozoides separados mediante ambos procedimientos (Iritani, 1991).

Antes de que los espermatozoides sean capaces de fecundar a los ovocitos deben experimentar un proceso de preparación conocido con el nombre de capacitación. Cuando se determinó la composición de las secreciones oviductales, se comprobó un elevado contenido en glucosaminoglicanos (Lee y Col, 1984), cuyo papel es determinante en la capacitación espermática y en la reacción acrosómica (Parrish y Col., 1986). Además,

observaron que la heparina se fijaba directamente a las proteínas de superficie de los espermatozoides facilitando la reacción acrosómica (Ax y Col., 1987). A partir de este momento comenzó a emplearse la heparina para inducir la capacitación espermática de los espermatozoides bovinos *in vitro*. Inicialmente se realizaba una preincubación de los espermatozoides en un medio capacitante, antes de incorporarlos al medio de cultivo en el que se encontraban los ovocitos. Posteriormente, algunos autores (Shi, 1991) observaron que la incorporación directa de la heparina al medio de fecundación permitía incrementar el porcentaje de ovocitos fecundados y el de blastocistos obtenidos.



**Gráfico N° 02:** Secuencia de los principales eventos que sufre el espermatozoide hasta la fusión con el ovocito. (Whittingham, 1979).

### 1.10.2. Capacitación espermática y reacción acrosomal

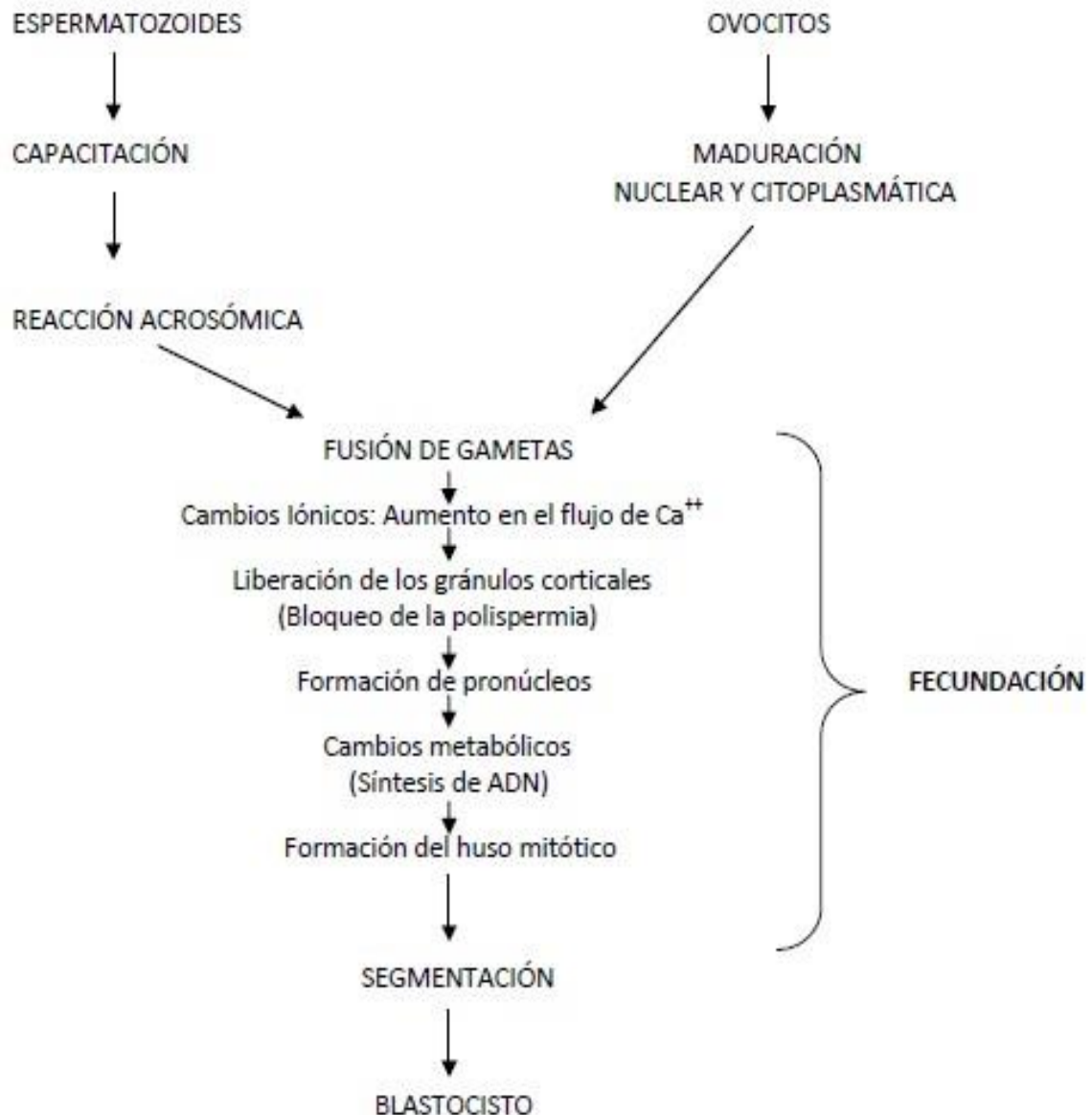
La capacitación espermática es la condición fisiológica que deben cumplir los espermatozoides para adquirir su capacidad fecundante. Ello se da a través de la remoción de los factores decapacitantes, derivadas de la vías genitales masculinas y la interacción de estas células con los llamados factores capacitantes que se encuentran en el tracto genital femenino que se desarrolla en el recorrido de la migración espermática (Palma, G., 2001). Básicamente este mecanismo consiste en cambios en la composición lipoproteica de la membrana espermática, aumento en el metabolismo y de la hipermotilidad del espermatozoide, que involucra un incremento en la motilidad la cual pasa de una motilidad progresiva rectilínea a un patrón de movimientos vigorosos (Palma, G., 2001). El proceso de capacitación espermática ocurre en la región ístmica del oviducto, los componentes de la

superficie espermática son modificados o eliminados por secreción del aparato reproductor femenino lo que desestabiliza la bicapa fosfolipídica y permite la activación acrosomal. En cuanto a la reacción acrosomal consiste básicamente en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana externa del acrosoma seguida de una vesiculación extensa sobre el segmento anterior del acrosoma. Tanto la fusión y vesiculación del acrosoma da lugar a la liberación de la hialuronidasa y acrosina enzimas hidrolíticas que permiten al espermatozoide digerir y formar un pequeño orificio a través del cual penetrará la zona pelúcida (Hafez, 2002).

### **1.11. Fertilización *in vitro***

La fertilización *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. 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. Sin embargo existen poco reportes de FIV en estas especies (Palma, 2001). En otro estudio se separaron epidídimos de testículos de llama macho y se obtuvieron espermatozoides por centrifugación en gradientes de Percoll, los cuales fueron utilizados para fecundar ovocitos maduros *in vitro*, logrando por primera vez el desarrollo de embriones producidos por FIV. En éste 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 (Del Campo y Col, 1994).





**Gráfico N° 03:** Secuencia de eventos básicos de la fecundación en mamíferos (Whittingham, 1979).

### 1.11.1. Reconocimiento y fusión de gametos

El espermatozoide tiene que atravesar las barreras presentes en el ovocito entre las que se encuentra las células del cúmulus, la zona pelúcida y la membrana plasmática.

La reacción acrosomal puede ocurrir antes o después de la fijación de la cabeza espermática a los receptores glucoproteicos en la zona pelúcida, pero para la fijación es esencial que el gameto tenga el acrosoma intacto. La unión de la cabeza del espermatozoide a ZP3 permite que ocurra interacciones con otros componentes de la zona, los cuales estimulan la activación del acrosoma (Hafez, 2002).

### **1.11.2. Medios para la fecundación**

El medio que se utiliza para esta etapa se compone básicamente de un medio stock que puede ser TALP-Fiv o TL suplementado con piruvato, BSA, gentamicina y la heparina. La heparina es un glucosaminoglicano e induce la capacitación espermática, que finaliza en la reacción acrosomal y permite la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida. En resumen la heparina se asocia al espermatozoide provocando cambios en su membrana plasmática y alterando los sacáridos presentes en su superficie, incrementando los niveles intracelulares de AMPc y  $Ca^{2+}$ , eleva el pH intracelular (Fernández y Col).

Eliminando de este modo los factores descapacitantes presentes en la membrana plasmática del espermatozoide.

### **1.12. Cultivo de embriones**

El cultivo de embriones consiste en proveer al cigoto de adecuada nutrición y ambiente controlado, manteniendo niveles de  $CO_2$ , temperatura y humedad previamente definidas hasta que alcance un estadio de desarrollo que permita su transferencia o manipulación para el cual fue destinado (Gandolfi y Moor, 1987).

Existe evidencia sobre la particular función del oviducto en la provisión de compuestos esenciales para el normal desarrollo del embrión, estos pueden incluir ciertas proteínas oviductales y factores de crecimiento. Se sabe que el embrión es incapaz de sobrevivir por sí mismo posterior a la fecundación, sino que se apoya en el aporte nutricional de elementos somáticos del oviducto y útero (Gandolfi y Moor, 1987). Se piensa que hay ciertas proteínas especializadas que son secretadas por el oviducto durante el paso del embrión temprano, estas se unen a la zona pelúcida y luego se incorporan al citoplasma embrionario.

#### **1.12.1. Desarrollo embrionario temprano**

La segmentación o división embrionaria, es un proceso después de la fecundación, los cigotos experimentan varias divisiones mitóticas, por ello cada célula hija o blastómero recibe el juego completo de cromosomas, sin aumento de masa celular. Esta secuencia de duplicaciones continúa durante el resto del periodo de segmentación temprana. Las segmentaciones iniciales suelen ocurrir simultáneamente en todos los blastómeros, pero la sincronización se pierde inevitablemente y los blastómeros comienzan a dividirse de manera independiente unos de otros. Una vez que el embrión ha formado 9-16 blastómeros, se denomina mórula (Hafez, 2002).

La mórula compacta, es visible a los 5 a 6 días de cultivo, donde el número de blastómeros es de aproximadamente de 32-64. Sus blastómeros están unidos y constituyen una masa compacta que ocupa sólo el 60-70% del espacio previtelino. La compactación es considerada como uno de los signos de diferenciación embrionaria, aunque los blastómeros conserven su capacidad totipotente (Palma, G. 2001).

El blastocisto temprano, es visible a los 7 días, el número de blastómeros es de 100-200 células. Se caracteriza por el comienzo del transporte de fluido en las células trofoectodérmicas o trofoblasto y por la formación de una cavidad llamada blastocele en el interior del embrión, dando la apariencia de un anillo de sello (Palma, G. 2001).

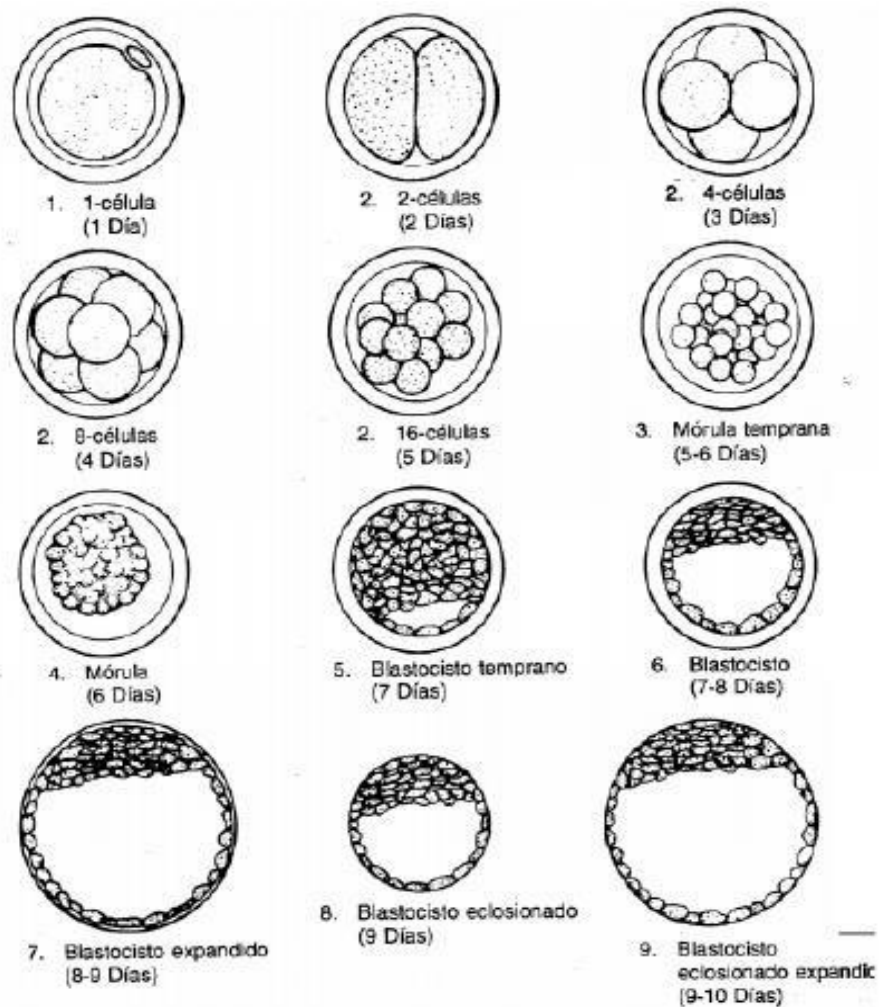
El blastocisto es visible entre el día 7-8 del cultivo, el número de blastómeros es de 100-200 células. Existe una marcada diferencia entre las células del trofoblasto, que constituye una pared que se adosa a la zona pelúcida y la masa celular (o disco embrionario) interna y más oscura (Palma, G. 2001).

El blastocisto expandido, visible entre el día 7-8 del cultivo, con más de 200 células. El diámetro aumenta considerablemente, con el consecuente adelgazamiento de la zona pelúcida. La presión creciente del blastocisto en crecimiento provoca la ruptura de la zona pelúcida, a través de la cual comienza su protrusión (Palma, G. 2001).

El blastocisto protruido, visible el día 8 y 9, con 200 a 800 células, los embriones han abandonado la zona pelúcida. Su forma puede ser esférica, con un blastocele bien definido o colapsado. Los blastocistos protruidos pueden ser igualmente transferidos, sin embargo, los embriones desprovistos de la zona pelúcida son extremadamente frágiles y pegajosos, razón por la cual se acostumbra a transferir estadios de mórulas tempranas a blastocistos (Palma, G. 2001).

### **1.12.2. Estadio de desarrollo embrionario**

De acuerdo a las normas de la International Embryo Transfer Society (IETS, 1996). La clasificación de los embriones en función de su estadio de desarrollo se efectúa de manera numérica de la siguiente manera:



**Gráfico N° 04:** Clasificación de los embriones según normas IETS.

El código para el grado de desarrollo es numérico. El número 1 significa un ovocito sin fecundar o un embrión de una célula. El número 2 identifica embriones con 2 a 16 células. El número 3 identifica una mórula temprana, y los números 4 a 9 identifican a los embriones en estadios posteriores a la compactación (INTA, 2010).

**Cuadro N° 01:** Valoración morfológica según IETS.

CÓDIGO	ESTADO	DÍAS
1-2	NO FERTILIZADO DE 2 A 12 CELULAS	2-4
3	MÓRULA	5-6
4	MÓRULA COMPACTA	6-7
5	BLASTOCISTO TEMPRANO	7
6	BLASTOCISTO	7-8
7	BLASTOCISTO EXPANDIDO	8
8	BLASTOCISTO ECLOCIONADO	8-10

### 1.13. Calidad embrionaria

De acuerdo a las normas, el código para clasificar la calidad embrionaria basada en la integridad morfológica de los embriones es de tipo numérico. Los códigos de calidad embrionaria varían de 1 a 4 (IETS 1996).

1. **Excelente.-** Masa embrionaria esférica y simétrica, con células (blastómeros) uniformes en cuanto a tamaño, color y densidad. Las irregularidades deberían ser relativamente menores, y al menos el 85% del material celular debería ser una masa embrionaria intacta y viable. La zona pelúcida deberá presentar superficies lisas, sin superficies cóncavas, planas o delgadas que pudieran causar adhesión de los embriones al material utilizado durante las manipulaciones.
2. **Bueno.-** Irregularidades moderadas en cuanto al aspecto, forma, tamaño, color y densidad de las células. Al menos el 50% del material celular deberá encontrarse intacto y correspondería con una masa embrionaria viable.
3. **Regular.-** Irregularidades mayores en la forma y tamaño de la masa embrionaria, así como en el tamaño, color y densidad de células individuales. Al menos el 25% del material celular deberá encontrarse intacto y correspondería con una masa embrionaria viable.
4. **Malo (muerto o degenerado).-** Embrión, ovocito y embriones de 1 célula degenerados, no viables.

### 1.14. Medios de cultivo

Para la maduración *in vitro* de los ovocitos se utilizan diferentes medios de cultivo (Ham's F-10 y Ham's F-12, Krebs Ringer Bicarbonato modificado, TCM-199, MEM, Tyrodes. Todos ellos presentan en su composición una mezcla de sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, glucosa, piruvato de sodio, hipoxantina, y rojo fenol como indicador. En dichos medios, los componentes varían en diferentes proporciones de sus componentes. A pesar de la amplia variedad de medios descrita, el más utilizado es el TCM- 199 (Wright y Bondioli, 1981; Gliedt y Col., 1996).

#### 1.14.1. Suplementación de los medios de cultivo.

Según el trabajo realizado está claramente establecido, que el medio de cultivo empleado para la maduración *in vitro* de los ovocitos influye significativamente en las tasas de fertilización *in vitro* (Brackett y Zuelke, 1993).

El medio de maduración de los ovocitos, es suplementado con suero fetal bovino (SFB), suero de vaca en celo (SVC) o albúmina sérica bovina (BSA).

Estos elementos, favorecen la expansión de las células del cúmulus y la producción de diversos factores que promueven el reinicio de la meiosis granulosa (Fukui y Sakuma, 1980; Fukui y Ono, 1989; Lee y Col., 1996).

Otros suplementos utilizados en diferentes concentraciones, son los factores de crecimiento (EGF, IGF-I, IGF-II, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y activina,). Estos, son elementos que favorecen la maduración de los ovocitos y actúan como agentes mitogénicos sobre las células de la granulosa (Lee y Col., 1996).

Como indicamos anteriormente, las hormonas FSH y LH desempeñan un papel importante en los procesos de maduración *in vivo* y son utilizadas para la maduración *in vitro*. También se presentan, estrógenos, progesterona y hCG, que son diferentes suplementos comúnmente utilizados en los medios de cultivo y tienen acción positiva en la maduración *in vitro* de ovocitos (Leibfried y First, 1979; Fukui y Col., 1982; First y Parrish, 1987). En un estudio realizado se determina la importancia de la adición al medio de cultivo (TCM-199) de diferentes concentraciones de hormonas FSH, LH, estrógenos y suplementos como SFB e insulina. Los resultados obtenidos, demuestran que la adición de estrógenos favorece las tasas de maduración *in vitro* en comparación al aporte de FSH, LH o insulina (Stubblings y Col., 1988).

Sin embargo, la adición de FSH y LH favorecen las tasas de fertilización *in vitro*. La adición de LH y EGF o EGF-I al medio de maduración, también favorece el desarrollo de los futuros embriones (Fukui y Ono, 1989; Harper y Brackett, 1992).

Uno de los mecanismos por los cuales la adición de la hormona LH a los medios de cultivo, favorece la tasa de ovocitos madurados *in vitro*, es el incremento de la energía disponible para el ovocito en el medio ambiente de cultivo (Brackett y Zuelke, 1993). Compararon la utilización de suplementos SFB y BSA en medio Tyrode's modificado, con 0.2 Mm de piruvato de sodio y 10 mg/ml de FSH. El SFB, como suplemento proteico, fue superior a BSA tanto en el grado de maduración alcanzado como en la fertilización (Leibfried-Rutledge y Col., 1989).

#### **1.14.1.1. Suplementación con aminoácidos**

Normalmente estos sirven como tampones celulares del pH, como “pool” para la síntesis proteica y fuente de energía. Mucho de los aminoácidos nutricionales, como la fenilalanina, tirosina, lisina, valina y treonina son apenas utilizados por las células embrionarias, mientras

que otros, como la glutamina, son activamente metabolizados y muy utilizados como fuente energética durante el desarrollo embrionario.

#### **1.14.1.2. Suplementación con vitaminas**

Cumplen un papel importante como coenzimas en el metabolismo de los carbohidratos y de los aminoácidos, igualmente las vitaminas hidrosolubles son necesarias para la expansión del blastocisto y la salida de la zona pelúcida en los embriones de hámster y de conejo. La colina e inositol, incluidas como vitaminas juegan un papel de substrato más que de catalizadores (Palasz, A. y De la fuente, 2000).

#### **1.14.1.3. Suplementación con fuentes energéticas**

Las fuentes de energía más comunes en el medio de cultivo son el lactato, el piruvato y la glucosa. Estos substratos se han encontrado en el líquido oviductal sus función difieren en los medios de cultivo de las diferentes especies animales y en los diferentes estadios de desarrollo. En los estadios más tempranos (embriones de 1 -2 células) se utiliza el piruvato y/o lactato pero no la glucosa (Palasz, A. y De la fuente, 2000).

Se ha demostrado que durante los primeros estadios, antes de la activación del genoma embrionario, los embriones utilizarían perfectamente piruvato, lactato y glutamina como fuente de energía, aumentando considerablemente la utilización de glucosa posteriormente. Sin embargo, a partir del estadio de 8-16 células, en bovinos y en respuesta de una alta demanda energética necesaria para la compactación, formación y expansión del blastocelo los embriones bovinos utilizan la glucosa como fuente energética (Palma, 2001).

#### **1.14.1.4. Suplementación proteica**

La adición de suero fetal bovino y de albumina sérica bovina, estos dos compuestos tienen un papel similar, aunque no del todo conocido ambos están compuestos de una forma muy variable, debido a la escasa definición de sus componentes. El SFB o FCS y el BSA afectan al pH del medio y actúan como quelantes de iones metálicos, contienen factores de crecimiento y ciertas cantidades variables de hormonas que inciden en la proliferación y diferenciación celular, además sirven como agentes activos de superficie (Palasz, y De la fuente, 2000).

### **1.14.2. Medio de cultivo SOF**

Se caracteriza por ser un medio con bajos niveles de Na y altos niveles de K, comparados con los niveles plasmáticos. Estos dos elementos son cuidadosamente balanceados al formular los medios de cultivo, así como: el magnesio, calcio, bicarbonato, sulfatos y fosfatos. La composición iónica, el pH, la osmolaridad y el contenido macromolecular contenidas en el líquido oviductual difieren enormemente de los del plasma sanguíneo. Esta generalmente aceptado que el cloruro sódico es necesario para regular la osmolaridad del medio de cultivo, y que el calcio y el potasio son esenciales para el desarrollo embrionario. La ausencia de calcio en el medio de cultivo resulta en una reducción de las divisiones embrionarias y una incapacidad para la compactación de las mórulas superficie (Palasz, y De la fuente, 2000).

Los análisis bioquímicos muestran que el fluido oviductual es un medio complejo constituido por una sutil mezcla de un exudado de sustancias derivadas del plasma sanguíneo, de productos específicos de secreción de origen epitelial y de los fluidos foliculares y peritoneales. La concentración de los nutrientes en el fluido folicular está generalmente por debajo de sus concentraciones en el plasma, lo que indica que el transporte a través del oviducto ocurre por difusión. Algunos componentes del fluido oviductual como iones, albúmina, inmunoglobulinas, glucosa y piruvato se consideran que son transferidos de la sangre, mientras que un número de proteínas específicas del oviducto son sintetizadas por las células epiteliales superficiales (Palasz, y De la fuente, 2000).

El fluido oviductal sintético, este medio es una solución salina relativamente simple que contiene BSA, piruvato, lacto, glucosa y antibióticos. Su composición está basada en la de las secreciones de las trompas de Fallopio ovinas y su concentración es muy parecida a la hallada en el fluido oviductal de oveja. Aunque posteriormente su composición fue modificada por (Leibfred-Rutledge y Col. 1989).



## **CAPITULO II**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1. Lugar de ejecución**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán, ubicado en el Distrito de Andrés Avelino Cáceres, Provincia de Huamanga, Departamento de Ayacucho a una altitud de 2735 msnm y latitud 13° 10'09s, con una temperatura promedio 12-18°C, precipitación pluvial de 500 mm, humedad relativa promedio 40-50% (SENAMHI, 1993).

Las muestras de ovarios y testículos de alpaca fueron colectados en el Camal Municipal de Pilpichaca, Provincia de Huaytará, Departamento de Huancavelica ubicado a 4092msnm.

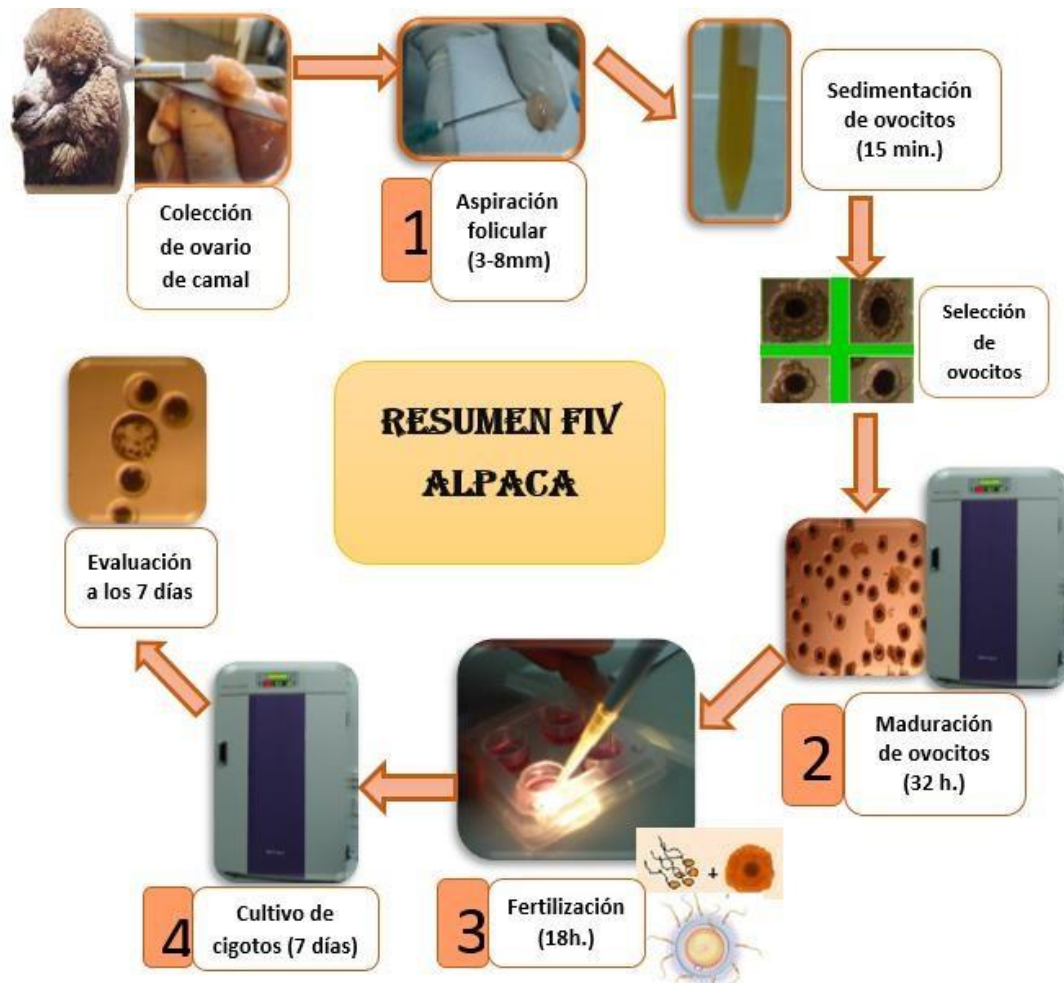
#### **2.2. Duración**

La parte pre-experimental y experimental tuvo una duración de 12 meses y se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán Ayacucho.

#### **2.3. Población y Muestra**

La población estuvo conformada por todas las alpacas sacrificadas en el Camal Municipal de Pilpichaca, como muestra se tomó un total de 370 ovarios de manera no probabilística por las características de las mismas, para cuyo efecto se consideró los criterios:  
Oportunidad y cantidad de animales beneficiados.

**2.4. Procedimiento experimental:** Se realizó de la siguiente manera:



**Gráfico N° 05:** Secuencia de la producción *in vitro*.

## 2.5. Maduración *in vitro*

### 2.5.1. Preparación de medios

Un día antes a la obtención de ovarios y testículos se prepararon los medios de manipulación que se muestran en el (Anexo N° 02, Cuadro N° 13), el medio de maduración de ovocitos (Anexo N° 02, Cuadro 14), y medio de transporte de ovarios (Anexo N° 02, Cuadro N° 12).

Para la preparación de medio de transporte (solución salina fisiológica al 0,9%), se pesaron 0.9g de cloruro de sodio y se diluyó en una probeta de 1000ml de agua destilada, se llevó al autoclave por 15 minutos para su esterilización en una botella de vidrio estéril.

### 2.5.2. Obtención de ovarios y testículos

La recolección de los ovarios se realizó de alpacas beneficiadas en el Camal Municipal de Pilpichaca-Huancavelica, las muestras fueron colectadas inmediatamente una vez realizada la evisceración de las alpacas y colocadas a un termo que contiene solución salina fisiológica

más gentamicina 1 ml/ 1 litro de solución, a una temperatura de 37°C. Los testículos fueron colectados una vez realizada el desuello y colocados en papel toalla.

Terminado la colección de ovarios y testículos estos fueron trasladados desde el camal de Pilpichaca al Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA-CANAAN-AYACUCHO.

Los ovarios se lavaron dos veces con solución salina fisiológica (SSF) al 0.9% más antibiótico a una temperatura de 37°C, para eliminar la sangre y adherencias, estos se depositaron en un vaso precipitado de 50 ml con solución salina fisiológica y se mantuvieron atemperados a 37°C en baño maría hasta finalizar la aspiración de todo los ovarios.

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

Se procedió al secado de cada uno de los ovarios con papel toalla para su posterior aspiración de folículos mayores de 3mm y menores de 8mm con aguja N° 21 G, en jeringas de 5 ml, el líquido folicular aspirado fue depositado en tubo falcón de 15 ml, a 37°C de temperatura, una vez terminada la aspiración folicular se esperó 15 minutos para la sedimentación de los ovocitos, pasado este tiempo se eliminó el sobrenadante obteniéndose de 2 a 3 ml de precipitado, el cual fue depositado sobre placas Petri que contenían medio de manipulación atemperada, las placas Petri fueron demarcadas en cuadrículas para una mejor y rápida selección de los ovocitos.

La selección de ovocitos se realizó con un estereoscopio incorporado a una platina térmica a 38 ° C, se seleccionaron ovocitos de categoría I, II descartando aquellos ovocitos que tienen menos de una capa de células de cúmulus u ovocitos con cúmulus muy oscuros. El lavado de los ovocitos fueron 2 veces con medio de manipulación y por último en medio de maduración para ser depositadas en placas multipocillos (placas multiwell).

### **2.5.4. Maduración de ovocitos**

Los ovocitos seleccionados fueron depositados en placas multiwell y transportadas a la incubadora por un tiempo de 32 horas a una temperatura de 38.5°C, 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>. Transcurridas las 32 horas de maduración se observó la expansión de las células de cumulus que nos indica una buena maduración, y con una micropipeta se trasladaron los ovocitos expandidos a otra placa multiwell con medio de fertilización.

En el Gráfico N° 12, se observa el resumen de flujo de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca.

## **2.5.5. Fecundación *in vitro***

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

#### **2.5.5.1.1. Técnica de Percoll para selección de espermatozoides**

El método de recuperación espermatozoides por la técnica de Percoll se realizó de la siguiente manera:

Se depositó 1ml de Percoll al 45% en un tubo eppendorf de 3ml, por las paredes y con mucho cuidado se adicionó 1 ml de Percoll de 90%, y se enrazo con 1 ml de espermatozoides, evitando en todo momento que se mezclen, se pudo observar claramente la formación de tres capas.

Se llevó a centrifugar a 1300 rpm x 20 minutos, se eliminó el sobrenadante, inmediatamente se adicionó 1 ml de medio de capacitación y se volvió a centrifugar a 1000 rpm x 10 minutos, después se hace el segundo lavado quitando el sobrenadante y agregando 1 ml de medio de capacitación a 1000rpm por 10 minuto, se saca el sobrenadante y se sobra 20ul de pellet para inseminar los ovocitos. En el Gráfico N° 13, se observa el resumen del flujo de fertilización *in vitro* utilizando el método de Percoll.

#### **2.5.5.1.2. Técnica de Swim up**

En un tubo falcón se adicionó los espermatozoides y medio Sp-TALP en las mismas proporciones de acuerdo a la cantidad de semen.

Se centrifugó a 1800 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 2 ml de medio de cultivo Fert-TALP y se volvió a centrifugar a 1800 rpm por 5 minutos, nuevamente se eliminó el sobrenadante y el pellets con ayuda de una micropipeta fueron depositado con mucho cuidado en la base de un tubo eppendorf que con medio Fer-TALP, y se llevó a incubación, colocándose en una posición de 45° de inclinación por 30 minutos y una temperatura de 38.5°C, para que los espermatozoides vivos y más motiles migren hacia la superficie, pasado este tiempo se tomó el sobrenadante aproximadamente 5-10 ul para depositar en cada pocillo con los ovocitos, posteriormente las placas fueron transportadas a incubación por un tiempo de 18 horas hasta la respectiva fertilización. En el Gráfico N° 14, se observa el resumen flujo de fertilización *in vitro* utilizando el método de Swim up

## **3.5.6. Cultivo de embriones**

Pasados las 18 horas de fertilización se retiró la placa multipocillos con los presuntos cigotos de la incubadora, para luego remover la células de cúmulus por pipeteo, se lavaron por 2 veces en medio de manipulación en una placa de 30mm y por último en otra placa que

contiene medio de cultivo (Anexo N° 2, Cuadro N° 16), finalmente fueron depositados en una placa multipocillo con medio de cultivo y en el centro de la placa multipocillos entre los pocillos se depositó 2ml agua destilada para mantener la humedad y se llevó a incubación por un tiempo de 7 días. En el Gráfico N° 15, se observa el resumen flujo de cultivo *in vitro* de ovocitos de alpaca.

### 2.5.7. Clasificación de embriones

Transcurrido los 7 días de cultivo, se evaluaron y clasificaron los embriones siguiendo las reglas establecidas por la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria IETS, los embriones se clasificaron de excelente (1) a intransferible (5).

**Cuadro N° 02.** Escala de Clasificación Embrionaria de (ITES, 1998).

Grado	Características
1	Excelente calidad. No fragmentado, de forma esférica y simétrica, sin ninguna irregularidad y células completas.
2	Buena calidad. Bordes con algunas irregularidades en el contorno y muy poco daño en las células que lo conforman.
3	Mediana calidad. Embrión pequeño con zonas oscuras, contornos irregulares y con algunas células dañadas.
4	Mala calidad. Embrión colapsado. Muestran áreas de degeneración y muchas células destruidas.
5	Intransferible. Embriones colapsados muy oscuros o retardados, mórulas oscuras y todos los estadios más jóvenes a mórula u ovocitos sin fertilizar.

### 2.5.8. Diseño estadístico:

Se utilizó la prueba de independencia de Chi Cuadrado cuya fórmula es la siguiente:

$$X^2 = \sum (o_i - e_i)^2 / e_i \text{ (Kaps and Lamberson, 2010)}$$

**Donde:**

$X^2 =$  Es el chi cuadrado calculado  $o_i =$  Es la frecuencia observada en la  
i-ésima fila, j-ésima columna  $e_i =$  Es la frecuencia esperada en la  
i-ésima fila, j-ésima columna

Se utilizó la prueba t de Student para detectar la existencia de diferencias significativas entre las medias de las variables cuantitativas para los dos grupos de datos (Percoll y Swin up).

Para el análisis de los datos se ha utilizado el programa estadístico **SAS®** (SAS 9.2, Institute. Inc., Cary, NC, USA).

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**3.1. Promedio de ovocitos recuperados por ovario de la alpaca (*Vicugna pacos*)** La colección de ovarios y selección de ovocitos representan la etapa inicial de este proceso, los ovarios se colectaron de hembras de diferentes edades y condiciones fisiológicas, las cuales fueron obtenidas del Camal Municipal de Pilpichaca, Provincia de Huaytará, Departamento de Huancavelica, Se recolectaron 370 ovarios del Camal Municipal de Pilpichaca de los cuales se aspiraron los folículos mayores de 3mm y menores de 8mm de diámetro recuperando un total de 1137 ovocitos/ovario haciendo un promedio de 3.6 ovocitos por ovario los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, indican que el número promedio de ovocitos aspirados por ovario de alpaca fueron:  $3.60 \pm 0.70$  (Cuadro N° 3).

**Cuadro N° 03. Promedio de ovocitos por ovario de la alpaca (*Vicugna pacos*)  
Ayacucho 2013.**

Promedio $\pm$ E.E.	Coefficiente de variabilidad, %	Mínimo	Máximo
$3.60 \pm 0.70$	67.38	2.07	10.91

Estos resultados obtenidos se encuentra en un rango superior a lo encontrado por Ruiz y Col., (2007) quienes reportaron un total de 3,5 COCs/ovario, pero inferior a lo reportado por Santayana, (2011) que obtuvo 5.04 COCs/ovario y Gamarra y Col., (2008) que obtuvieron una media de 8.5 ovocitos/ovario de alpaca. Es importante señalar que esta variabilidad en la obtención de los COCs/ovario, se debe muchas veces a la experiencia y habilidad del operador para aspirar los folículos, metodología utilizada en la aspiración de los ovocitos (aspiración con ayuda de una jeringa y disección de los ovarios) y las variaciones propias de cada donante (edad del animal, estado reproductivo).

**Cuadro N° 04. Categorización morfológica de ovocitos colectados por ovario de Alpaca (*Vicugna pacos*) Ayacucho 2013.**

Repetición	N° OVARIOS	N° DE OVOCITOS	CATEGORIAS		
			CALIDAD I	CALIDAD II	CALIDAD III
1	38	145	50	80	15
2	52	120	55	50	15
3	32	103	43	51	9
4	11	120	50	55	15
5	42	87	45	30	12
6	22	75	37	27	11
7	38	100	53	30	17
8	22	75	38	26	11
9	28	60	28	25	7
10	40	90	43	33	14
11	20	50	30	15	5
12	25	112	52	48	12
<b>Promedio ± D.S.</b>	<b>30.83±11.56</b>	<b>94.75±27</b>	<b>46.08 ± 8.93</b>	<b>41.34 ± 18</b>	<b>12.58 ± 3.58</b>

En el cuadro N° 04: Se observa la categorización morfológica de ovocitos, donde se obtuvieron 46.08±8.93, 41.34±18 y 12.58±3.58% de ovocitos de categoría I, II y III respectivamente. Estos resultados son superiores en categoría I e inferiores en categoría II y III a lo encontrado por Santayana, (2011), quien reportó 19.75 ± 4.10, 49.49 ± 4.99, 16.64 ± 1.41% para categoría I, II, III respectivamente. Estos resultados se deben posiblemente a que los ovarios fueron transportados a una temperatura que oscila entre los 35-38°C, a diferencia de Santayana, (2011) quien transportó los ovarios a una temperatura (15-18°C), ya que la temperatura de conservación durante su traslado influye directamente en la categoría de los ovocitos recuperados.

### **3.2. Porcentaje de ovocitos aptos para el proceso de maduración en alpaca (*Vicugna pacos*)**

En el presente trabajo de investigación se seleccionaron los ovocitos de categoría I y II, representados por ovocitos rodeados completamente por más de dos capas de células de cúmulus así como la apariencia homogénea y compacta.



**Cuadro N° 05. Porcentaje promedio de ovocitos por ovario aptos para la maduración *in vitro* en alpacas (*Vicugna pacos*) Ayacucho 2013.**

Variable	Promedio $\pm$ D.S.	Coefficiente de variabilidad, %	Mínimo	Máximo
Porcentaje de ovocitos para la maduración	87.32 $\pm$ 2.51	2.87	83.00	91.26

Los resultados encontrados en el presente trabajo de investigación se muestran en el cuadro N° 5, donde se obtiene un promedio de ovocitos aptos para la maduración *in vitro* de: 87.32  $\pm$  2.51%, con un coeficiente de variación de 2.87%. Esto significa que de los 1137 ovocitos recuperados, se seleccionaron como aptos para el proceso de maduración 994 ovocitos de calidad I y II (Fotografía N° 11 y 12). Este resultado es superior a los obtenidos por Ruiz y Col., (2007), Santayana (2011), quienes reportaron 69% y Gamarra y Col., (2008) quienes reportaron 81% de ovocitos aptos para la maduración; este resultado se debe posiblemente a la temperatura de transporte, en el presente trabajo fueron transportadas a una temperatura de 35-38°C a diferencia de los demás autores que transportaron a temperaturas inferiores a lo mencionado, y a la vez inferior a los 89% obtenidos por Ratto y Col., (2005).

### 3.3. Porcentaje de ovocitos a la fertilización en alpacas (*Vicugna pacos*)

En el presente trabajo de investigación se realizó el lavado, la selección y capacitación de células espermáticas por dos métodos: gradiente de Percoll y Swin up.

**Cuadro N° 06. Porcentaje promedio de ovocitos a la fertilización, según tratamiento Ayacucho 2013.**

Métodos de capacitación	N° Corridas	Promedio $\pm$ D.S.	Coefficiente de variabilidad, %	Mínimo	Máximo
PERCOLL	6	93.72 $\pm$ 2.86 <sup>a</sup>	3.05	88.24	96.04
SWIN UP	6	96.00 $\pm$ 2.27 <sup>a</sup>	2.36	93.02	98.65

El cuadro N° 06, muestra los resultados obtenidos del porcentaje de ovocitos a la fertilización, según tratamiento, donde se tuvieron los siguientes resultados: 93.72  $\pm$  2.86% y 96.00  $\pm$  2.27 de ovocitos fertilizados por el método de gradiente de Percoll y Swin up respectivamente, al realizar el análisis estadístico se encontró que no hay diferencia

significativa para ambos métodos de capacitación de espermatozoides ( $p \geq 0.05$ ), prueba t-Student. Estos resultados son superiores en comparación a lo encontrado por Mendoza y Col., (2008) quienes reportaron 36% y 43.9% de segmentación para Percoll y Swin up respectivamente (embriones de 2-4 células). Estos resultados se deben posiblemente a que no se tomó en cuenta la aparición del segundo corpúsculo polar para determinar si los ovocitos fueron fecundados, debido a que no se contaba con colorantes para realizar las tinciones respectivas.

### 3.4. Porcentaje de mórulas según calidad obtenidas por dos métodos de capacitación espermática en alpaca (*Vicugna pacos*).

Trascurrido los 7 días de cultivo se procedió a la evaluación de los embriones (mórulas y blastocistos en diferentes estadios).

**Cuadro N° 07. Porcentaje de mórulas según calidad Ayacucho 2013.**

MÉTODOS DE CAPACITACION		N° Ovocitos	MORULAS				Total de mórulas
			Excelente	Buena	Mediana	Mala	
PERCOLL	N°	499	14	33	13	4	64
	%		21.88	51.56	20.31	6.25	100.00
SWIM UP	N°	361	12	25	4	3	44
	%		27.27	56.82	9.09	6.82	100.00

En el cuadro N° 07, se observa el porcentaje de mórulas según calidad, por el método de gradiente de Percoll y Swim Up, donde se obtuvieron las calidades de: excelente, buena, mediana y mala, estas fueron: 21.88, 51.56, 20.31 y 6.25%, respectivamente, en tanto que el porcentaje de mórulas utilizando el método Swin up las calidades: excelente, buena, mediana y mala fueron de: 27.27, 56.82, 9.09 y 6.82% respectivamente. Al realizar el análisis estadístico no existe diferencia estadística dentro de cada calidad ( $p \geq 0.05$ ) t de Student, cabe precisar que no se encontró reportes ni publicaciones acerca de calidad de mórulas en alpacas solo se encontró publicaciones de total de mórulas obtenidas, en el presente trabajo se encontró 15.80 y 11.54% (Anexo N° 07 Cuadro N° 26) de mórulas para los métodos de capacitación de gradiente de Percoll y Swim up respectivamente. Estos resultados son superiores a los encontrados por Gamarra y Col.,(2008) quienes reportaron 8% de mórulas utilizando la técnica de gradiente de Percoll, este resultado se debe posiblemente a que

gamarra y col., trabajo con semen congelado y utilizó suplementos de penicilamina, hipotahurina, epinfrina y heparina e inferiores a los encontrados por E. Huamán y Col., (2011) quienes reportaron 86% de mórulas utilizando una atmosfera de 90% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y un resultado de 78.26% de mórulas utilizando una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Estos resultados son inferiores a los reportados por E. Huamán y Col., (2011) ya que en el presente trabajo no se utilizó mezcla de gases en el cultivo *in vitro* de embriones en algunas corridas debido a la falta del balón con mezcla de gases.

### 3.5. Porcentaje de blastocistos según calidades obtenidas por dos métodos de capacitación espermática en alpacas (*Vicugna pacos*)

El porcentaje total de blastocistos obtenidos por los métodos de capacitación de células espermáticas, gradiente de Percoll y Swim up fueron: 8.4 y 3.9% respectivamente, de los cuales el porcentaje de blastocistos obtenidos según calidad se muestran en el siguiente cuadro para ambos métodos.

**Cuadro N° 08. Porcentaje de Blastocistos según calidad en alpaca (*Vicugna pacos*) Ayacucho 2013.**

MÉTODO DE CAPACITACION	N° Ovocitos	BLASTOCISTO				Total de blastocistos
		Excelente	Buena	Mediana	Mala	
PERCOLL	499	17	16	8	3	44
%		38.64	36.36	18.18	6.82	100.00
SWIM UP	361	3	8	1	0	12
%		25.00	66.67	8.33	0.00	100.00

Utilizando el método de gradiente de Percoll las calidades: excelente, buena, mediana y mala fueron: 38.64, 36.36, 18.18 y 6.82% respectivamente, y para el método de Swim up, las calidades: excelente, buena, mediana y mala fueron de: 25.00, 66.67, 8.33 y 0.00% respectivamente (Cuadro N° 08). El análisis estadístico nos indica que estos porcentajes dentro de cada calidad son similares ( $p \geq 0.05$ ) para prueba t de Student.

Cabe mencionar que no se encontró reportes ni publicaciones acerca de calidad de blastocistos en alpacas solo se encontró reportes de la obtención de blastocistos por dos métodos de capacitación de espermatozoides, en el presente trabajo se obtuvo : 8.4 y 3.9% de blastocistos para el método de Percoll y Swim up respectivamente Estos resultados son superiores en el método de gradiente de Percoll, e inferiores a Swin up a los reportados por Mendoza y Col., (2008), quienes encontraron 6.3% y 6.9% para Percoll y Swim up respectivamente, estos resultados se debe posiblemente mayor en gradiente de Percoll a que

en el presente trabajo se utilizó medio de capacitación a diferencia de Mendoza y col., que solo utilizó medio Sper-TALP y Fer-TALP ya que el medio de capacitación influye en la fertilización *in vitro* de ovocitos, e inferior al método de capacitación de Swim up debido a que en el presente trabajo los espermatozoides fueron refrigerados por 32 horas el cual repercute en la vitalidad y motilidad de los espermatozoides, sin embargo Ruiz y Col., (2007) reportaron 7.3 y 6.8% de blastocistos para gradiente de Percoll y Swin up respectivamente, el porcentaje de blastocistos por el método de Percoll no muestran diferencia significativa a lo encontrado con el presente trabajo de investigación, ya que en ambos casos se obtienen mayor porcentaje de blastocistos por el método de gradiente de Percoll.

**Cuadro N° 09. Número y porcentaje de mórulas y blastocistos, según calidad Ayacucho 2013.**

	Excelente	Buena	Mediana	Mala	TOTAL
MÓRULAS	26	58	17	7	108
%	24.07	53.70	15.74	6.48	100.00
BLASTOCISTO	20	24	9	3	56
%	35.71	42.86	16.07	5.36	100.00
TOTAL	46	82	26	10	164
%	28.05	50.00	15.85	6.10	100.00

En el cuadro N° 09: Se observa el porcentaje total de mórulas y blastocistos obtenidos según calidad: Excelente, buena, mediana y mala fueron: para mórulas: 24.07, 53.70, 15.74 y 6.48% y para blastocistos: 35.71, 42.86, 16.07 y 5.36% respectivamente. El análisis estadístico nos indica que estos porcentajes de mórulas y blastocistos dentro de cada calidad son similares ( $p \geq 0.05$ ). No se encontró reportes sobre calidad de mórulas y blastocistos, en el cuadro N° 09 se puede observar que la calidad buena es superior tanto en mórulas como blastocistos respecto a las calidades excelente, mediana y mala

**Cuadro N° 10. Porcentaje total de embriones obtenidos según calidad Ayacucho 2013.**

NUMERO y % DE EMBRIONES	EXCELENTE	BUENA	MEDIANA	MALA	INTRANSF	TOTAL
N	46	82	26	10	696	860
%	5.35	9.53	3.02	1.16	80.93	100.00

En el cuadro N° 10, se observa el porcentaje total de embriones obtenidos según calidad: excelente, buena, mediana, mala e intransferible las cuales fueron: 5.35, 9.53, 3.02 1.16 y 80.93% respectivamente.

No se encontró reportes ni publicaciones sobre trabajos de calidad de embriones en alpacas, los resultados obtenidos en el cuadro N° 10, sobre el porcentaje total de embriones según calidad se observa que la calidad de embriones de excelente, buena, mediana y mala son inferiores respecto a los intransferibles, estos resultados pudieron haberse a causas tales como: la interrupción eléctrica, variación en la atmosfera de la incubadora en el momento de abrir y cerrar la incubadora, contaminación de algunos medios, poca disposición de espermatozoides para la fertilización, entre otros, los cuales repercuten en que se incremente los porcentajes de ovocitos sin fertilizar, inhibición el desarrollo embrionario y contaminación de algunos pocillos con medio de cultivo, estos factores hacen que incremente los porcentaje de embriones intransferibles.

Cabe mencionar que diversos trabajos realizados sobre fertilización *in vitro* en camélidos sudamericanos con ovarios obtenidos de animales beneficiados en camales no muestran reportes de la calidades de embriones obtenidos, sólo se reportan el porcentaje de embriones (blastocisto) obtenidos.

De todos estos resultados se puede concluir que por medio de la fertilización *in vitro* en alpacas se puede obtener embriones de excelente, buena, regular y mala calidad ya que embriones de calidad excelente, buena y regular pueden ser transferidas a receptoras.

#### **IV. CONCLUSIONES**

1. La evaluación y selección de ovocitos obtenidos por punción folicular de ovarios procedentes de camal influye en el proceso de la maduración y la capacidad de desarrollo embrionario post fertilización *in vitro* en alpacas.
2. Con la fertilización *in vitro* de ovocitos colectados a partir de ovarios de alpacas beneficiadas se obtuvieron embriones de excelente y buena calidad, las cuales sirven para la transferencia de embriones.
3. Los métodos de selección y capacitación de los espermatozoides no influyen en la calidad de embriones obtenidos a partir de la fertilización *in vitro* en alpacas.

## V. RECOMENDACIONES

1. Continuar con estos trabajos de investigación con el objetivo de estandarizar protocolos de fertilización *in vitro* en alpacas que nos ayuden a obtener mayor porcentaje de embriones y de buena calidad.
2. En la preparación de los medios de maduración, fertilización y cultivo *in vitro* se debe tener mucho cuidado con la contaminación ya que esto influyen mucho en proceso de desarrollo de los embriones.
3. En la preparación de los medios de fertilización y cultivo se deben tener en cuenta el valor del pH, pues un desequilibrio de este involucra negativamente en el desarrollo celular y embrionario
4. Para los trabajos posteriores se debe tener en cuenta de contar con un motor debido a la interrupción del fluido eléctrico, ya que la ausencia de este por más de una hora influye en el desarrollo celular y embrionario.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Adams**, 2005. Comparative aspects of follicular dynamics in camelids. En: Rev. Inv. Vet. Perú. Suplemento 1. XXIV Reunión científica APPA. Lima. P 142-146.
- Anderson G.B.** 1991. Fertilization, early development, and embryo transfer. In: Cupps P.T. (Ed.), Reproduction in Domestic Animals. Academic Press, Inc. San Diego, California, pp. 279-313.
- Avery B.T. y Greve T.** 1995. Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for *in vitro* insemination. Theriogenology. 44:871-878.
- Ax RL, Gilbert GR y Shook GE.** 1987 Sperm quality and semen from bulls during heat stress have a lower affinity for binding hydrogen-3 heparin. J Dairy Sci 70:195.
- Brackett, B. G. y Zuelke, K. A.** 1993. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. Theriogenology. Vol. 39, pp. 43-64.
- Bravo, P.W.; Fowler, M. y Stabenfeldt. Lasley, B.** 1990. Ovarian follicular dynamics in the llama. Biol Reprod. 43:579-585.
- Bravo P.W.** 1997. Ovarian function in domesticated South American camelids. In: Current therapy in large animal Theriogenology. Edit Younquist, R. Vol II. Saunders Company Philadelphia. p 803 – 806.
- Combelles CM, Cekleniak NA, Racowsky C y Albertini DF.** 2002. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in *in-vitro* matured human oocytes. Hum Reprod 17: 1006-1016.
- Conti, M., Andersen, C., Richard, F., Mehasts, C., Chun, S., Horner. K., Jin, C. y Tsafirir, A.** 2002. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. Mol Cell Endocrinol. 187, pp. 153-159.
- Del Campo M. R y MX Donoso.** 1992. *In Vitro* maturation of llama (*Lama glama*) oocytes. Proc 12 th Int Cong anim reprod. 1992; vol 1. p 324.
- Del Campo M.; C Del Campo, M Donoso, M Berland y R Mapletoft.** 1994. *In Vitro* fertilization and development of *Lama glama* oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co culture. Theriogenology 41: 1219. 1229.
- Edwin Mellisho Salas** 2010. Manual de laboratorio de reproducción animal. Universidad Nacional Agraria la Molina.
- Elizabeth Huamán, Flamel Tiellacuri, Leandra Landeo y Jaime Ruiz** 2011. Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas. Universidad Nacional de Huancavelica.
- Farin PW, Crosier AE y Farin CE.** 2001. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. Theriogenology 55: 151-170.



- Fernández, H. y Esteban, T.** 2009. Efectos de diferentes niveles de glycerol y etelinglicol en el desarrollo de embriones partenogenicos de alpacas.
- Fernández, Hugo.** 2010. Fertilización *in vitro*. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia (LUZ).
- First, N. L., Parrish, J. J.** 1987. In vitro fertilization of ruminants. J. Reprod. Fertil. Vol. 34 (suppl), pp. 151-165.
- Freshney, I.** 1987. The culture environment. En: Culture of animal cells, a manual of basic technique. AR Liss, New York- USA.
- Fukui, Y., Sakuma, Y.** 1980. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. Biol. Reprod. Vol. 22, pp. 669-673.
- Fukui, Y., Fukushima, M., Terawaki, Y., Ono, H.** 1982. Effect of gonadotropin, steroids and culture media on bovine oocyte maturation. Vol. 18, pp. 161-175.
- Fukui, Y., Ono, H.** 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in-vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. J. Rep. Fert. Vol. 86, pp. 501-506.
- Gandolfi, F y R. M. Moor.** 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. Journal of Reproduction and Fertility. 81: 23-28.
- Gamarra, G, Gallegos, A., Alvarado, E., Asparrin y W. Vivanco.** 2008. First *in Vitro* embryo production in alpacas (*Lama pacos*). Reprod. Fétil. Pag. 177 – 178.
- Gerard, N., Loiseau, S., Duchamp, G. y Seguin, F.** 2002. Análisis of the variations of follicular fluid composition during follicular growth and maturation in the mare using proton nuclear magnetic resonance (1HNMR). Biol. Reprod.,124: 241-248
- Gibory, G. y Millar, J.** 1982. The ovary: follicle development, ovulation and luteal function. In: Zeneveld, L. and Chatterton, R. Biochemistry of mammalian reproduction. Willey Interscience. New York. USA.
- Gilchrist R.B. y Thompson J.G.** 2007. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. Theriogenology 67: 6–15.
- Gliedt, D. W., Rosenkrans, C. F. JR., Rorie, R. W., Rakes, J. M.** 1996. Effects of oocyte maturation length, sperm capacitation time, and heparinon bovine embryo development. Journal of Dairy Science. Vol. 79(4), pp. 532-535.
- Gordon I.** 1994. Laboratory production of cattle embryos. Primera edición- CAB internacional, Cambridge. Inglaterra. 1994.

- Gougeon, A.** 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 17, pp. 121-155.
- Hafez, E.** 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª edición. Edit. MC Graw Hill. España
- Harper, K. M y Brackett, B. D.** 1992. Enhanced bovine oocyte quality after *in vitro* maturation (IVM) with insulin-like growth factor-I (IGF-I) and gonadotropins. *Biol. Reprod.* Vol. 46, pp.67.
- Hoshi, H.** 2003. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology* 50:675-685.
- Huanca, W. y Adams GP.** 2007. Semen Collection and Artificial Insemination in Llamas and Alpacas. En: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, Youngquist R and Threlfall W. 2º Edition Saunders. Elsevier Inc. Pp. 869-873.
- Illera, M.** 1994. Reproducción de los animales domésticos. Ed. Aedos. Barcelona. España.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI).** 2012 - IV Censo Nacional Agropecuario.
- INTA.** 2010 Memoria técnica curso de graduación: Producción *in vitro* y criopreservación de embriones bovinos. Argentina, Balcarce: Junio, pp. 1-85.
- Iritani A** 1991. Micromanipulation of gametes for *in vitro* assisted fertilization. *Mol Reprod Dev* 28: 199-207.
- Iwata H, Hashimoto S, Ohota M, Kimura K, Shibano K y Miyake M** 2004. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction* 127: 159-164.
- Kalinowski, R., Berlot, T., Ross** 2004. Maintenance of meiotic prophase arrest in vertebrate oocytes by a Gs protein-mediated pathway. *Dev Biol.* 267, pp. 1-13.
- Katska, L., Smorag, Z.** 1985. The influence of culture temperature on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* Vol. 9, pp.205-212.
- Lee A. S, Bell J y Ting J** 1984. Biochemical characterization of the 94- and 78 kilodalton glucose-regulated proteins in hamster fibroblasts. 259:4616-4621.
- Lee, E. S., Fujii, Y., Fukui, Y.** 1996. A comparative study on developmental capacity to blastocysts derived from 1- and 2(3)-cell bovine embryos after *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology.* Vol. 45(6), pp.1151-1162.
- Leibfried, L., First, N. L.** 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* Vol. 48, pp. 76-86.

- Lenz, R. W., Ball, G. D., Leibfried, M. L., AX, R. L., First, N. L.** 1983. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature dependent processes. Biol. Reprod. Vol. 29, pp.173-179.
- Leibfried-Rutledge, M. L., Crister, E. S., Parrish, J. J., First, N. L.** 1989. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. Theriogenology. Vol.31, pp. 61-74.
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T y Boland MP** 2003. Oocyte and embryo quality: Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. Reprod Dom Anim 38: 259-267.
- Lu, K. H., Gordon, I., Gallager, M., Mcgovern, H.** 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. Vet. Rec. Vol. 121, pp. 259-260.
- Masui Y** 1990. The cytostatic factor (CSF) that causes metaphase arrest in amphibian eggs. En: Dale Nato B (ed) Mechanism of fertilization, 35-44.
- Mehlmann, L; Jones, T. y Jaffe, L.** 2002. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. Science. 297, pp 143-1345.
- Mendoza J. Ayunque A, triviño F, Ayuque G, Landeo L y Ruiz J.** 2008. Evaluación de métodos de recuperación de espermatozoides epididimarios para la fecundación *in Vitro* de ovocitos de alpaca. Efecto de la exposición a etilenglicol sobre el desarrollo partenogénico *in Vitro* de ovocitos de alpaca.
- Milligan S.** 1982. Induced ovulation in mammals. Rev Reprod Biol.4:1.
- Mochizuki, H., Fukui, Y., Ono, H.** 1991. Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes. Theriogenology. Vol. 36, pp. 973-986.
- Novoa, C.** 1991. Fisiología de la reproducción de la hembra. Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Cap. III Edic. Fernandez Baca, S Santiago. P. 93-103.
- Novoa C, Leyva V.** 1996. Reproducción en alpacas y llamas. Publicación científica. IVITA 26 (30): 3-18.
- Palma, Gustavo. A.** 2001. Biotecnología de la reproducción. Primera edición. Pp 225-282. INTA Argentina.
- Palasz, A.T. y De la fuente, J.** 2000. Cultivo de embriones bovinos: efecto de los medios de cultivo y de los requerimientos fisiológicos sobre la calidad de los embriones producidos *in vitro* parte (II).

- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH y First NL** 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25: 591– 600
- Rath D.** 2001. Producción *in vitro* de embriones porcinos. En Palma GA. Primera edición. Biotecnología de la reproducción. Argentina.
- Ratto M H, Berland M, Huanca W, Singh J y Adams G P.** 2005. In Vitro and *In Vivo* maturation of llama oocytes. *Theriogenology*. 63, 2445 –2457.
- Rose, T. A., y Bavister, B. D.** 1992. Effect of oocyte maturation medium on *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine embryos. *Mol. Reprod. Develop.* Vol. 31, pp. 72-77.
- Ruiz, Correa y Soto.** 2007. Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina. Instituto de Reproducción Animal - Universidad Austral de Chile.
- Ruiz Jaime A.** 2009. Vitricación de ovocitos de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis de doctorado, para optar el grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- Quintana, M.D., Campos, P. Herrera, C. Gallego y E. Padrón.** 2012. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos inmaduros para fertilización *in vitro* FIV obtenidos de hembras *Bubalus bubalis* enviadas a matadero. *Revista de Salud Animal* 34(1):53-56
- Santayana Rengifo Paulo Cesar** 2011. Tiempo de maduración de ovocitos de *vicugna pacos* “alpaca” en el desarrollo embrionario por fecundación *in vitro* Huancavelica.
- Salisbury, G.W., Vandemark, N.L. y Lodge, J.R.** 1978. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial en bóvidos. Ed. Acribia. Zaragoza. España.
- Sato, E., Iritani, A., Nishikawa, Y.** 1977. Factors involving in maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured *in vitro*. *Jap. J. Anim. Reprod.* 23:12-18.
- San Martín, M.; Copaira, M.; Zúñiga, J.; Rodríguez, R.; Bustinza, G.: Acosta, L.** 1968. Aspects of reproducción in the alpaca. *J. Reprod Fétil.* 16:395-399.
- Saeki, K.; Nacao, M., Hoshi, M. y Nagai, M.** 1995. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation of bovine oocyte in a protein – free médium. *Therigenology* 43:751-759.
- Shea, B. F., Latour, J. P., Bedirian, K. N., Baker, R.** 1976. Maturation *in vitro* and subsequent penetration of bovine follicular oocyte. *J. Anim. Sci.* Vol. 43, pp. 809815.
- Shi DS** 1991. Studies related to factors affecting the yield of bovine embryos produced by *in vitro* techniques. Ph.D. Thesis, National University of Ireland, Dublin

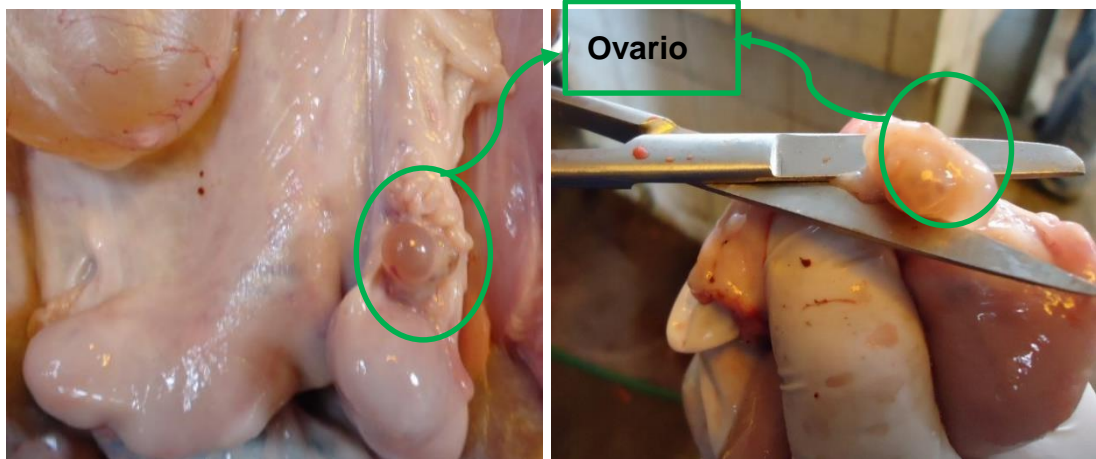
- Stubbings, R. B., Armstrong, D. T., Beriault, R. A., Basrur, P. K.** 1988. A method for aspirating bovine oocytes from small cesicular follicles: preliminary results. *Theriogenology*. Vol. 29, pp. 312.
- Sumar J.** 2007. Realidades y mitos en los camélidos sudamericanos. XX Reunión Asociación Latinoamericana de Producción Animal (APPA) XXX Reunión Asociación peruana de Producción Animal (APPA).
- Van de Wiel, D., Bar-ami., Tsafri, A. y De Jong, F.** 1983. Oocyte ion inhibitor, inhibin and steroid concentrations in porcine follicular fluid at various stages of the oestrous cycle. *Reprod Fertil* 68, pp.247-252.
- Wright, R. W., Bondioli, K. R.** 1981. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. *J. Anim. Sci.* Vol. 53, pp. 702-729.
- Whittingham DG** 1979. In vitro fertilization, embryo transfer and storage. *Br Med Bull.*; 35: 105.
- Yang BS, Im GS y Park SJ** 2001. Characteristics of Korean native, Hanwoo, calves produced by transfer of *in vitro* produced embryos. *Anim Reprod Sci* 67: 153-158.
- Younis, A. I., Brackett, B. G., Fayrer-Hosken, R. A.** 1989. Influence of serum and hormone on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Res.* Vol. 23, pp. 189-201.

## VII. ANEXO

**Fotografía N° 01: Camal Municipal de Pilpichaca- Huancavelica (Lugar de recolección de muestras (Ovarios y testículos)).**



**Fotografía N° 02 y 03: Recolección de ovarios de alpacas beneficiadas en camal**



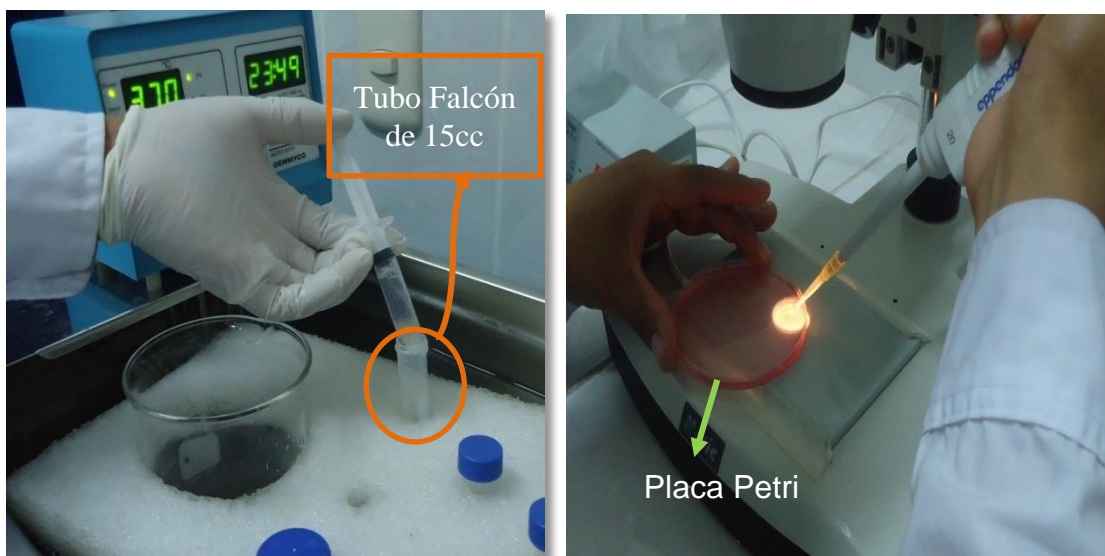
**Fotografía N° 4: Materiales (Termo para mantener la temperatura y transporte de ovarios de alpaca (*Vicugna pacos*))**



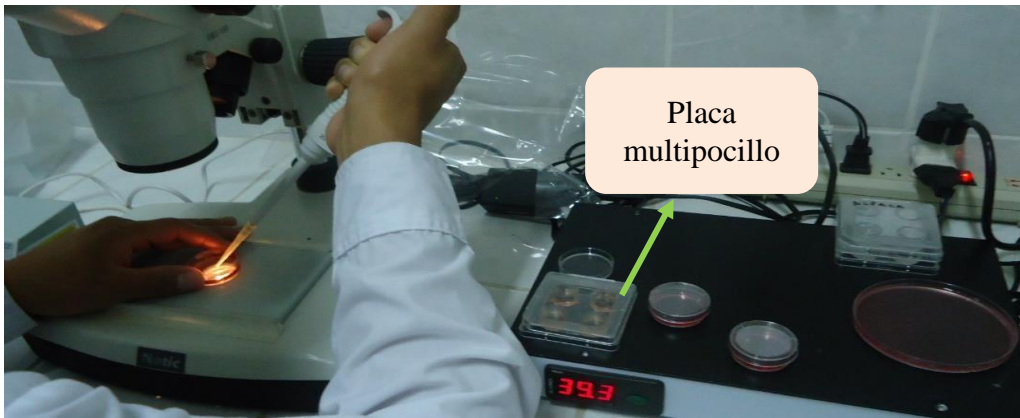
**Fotografía N° 05 y 06: Aspiración folicular de ovocitos de alpaca**



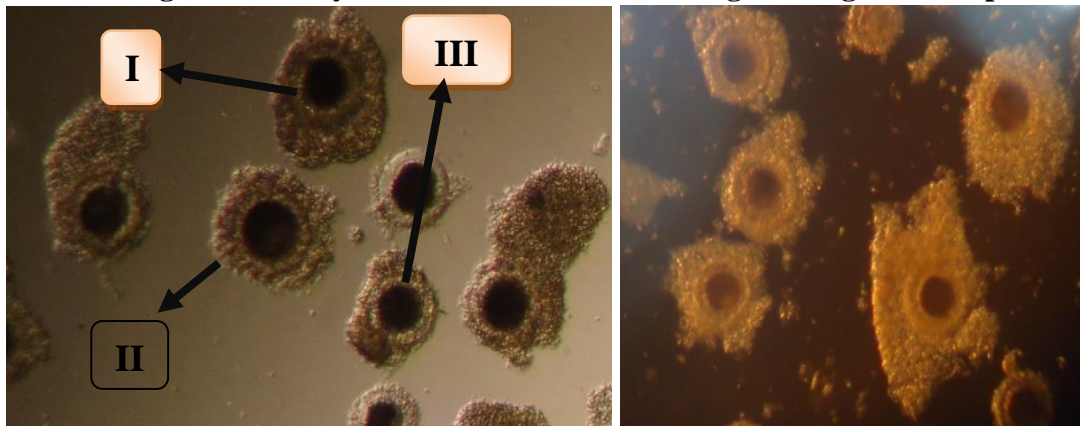
**Fotografía N° 07 y 08: Deposición de líquido folicular aspirado al tubo falcón de 15ml el cual está en baño maría, selección de ovocitos en el estereoscopio**



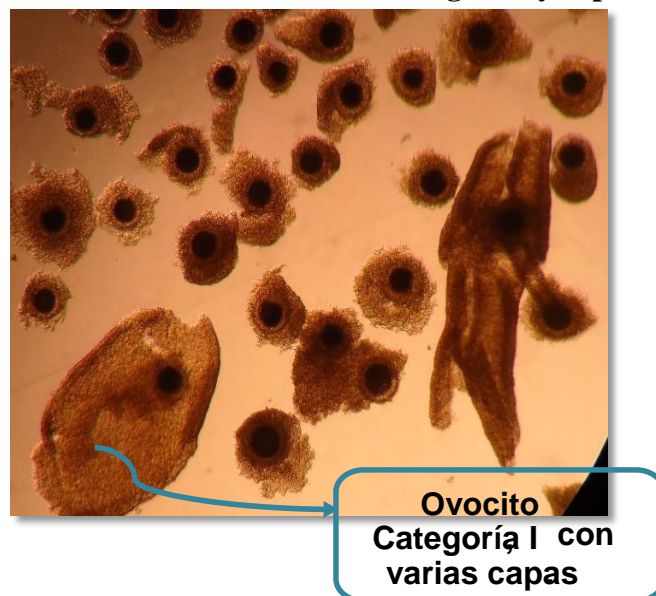
**Fotografía N° 09 y 10: Colocación de los ovocitos seleccionados en la placa multipocillos**



**Fotografía N° 11 y 12: Selección de ovocitos según categoría de alpaca**

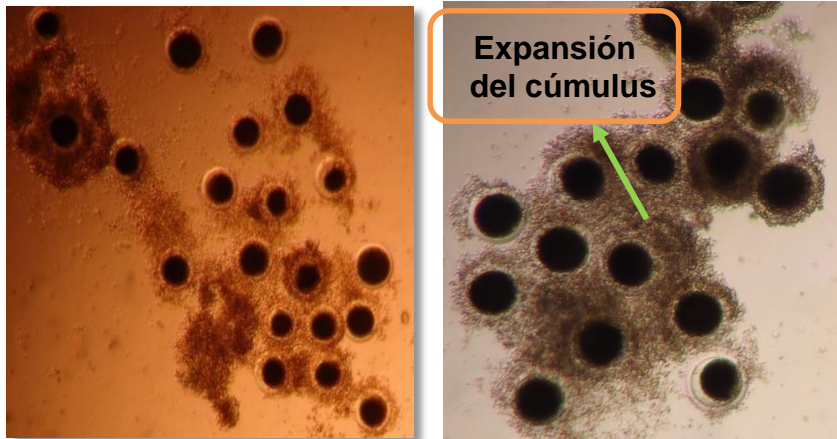


**Fotografía N° 13: Ovocitos de diferentes categorías y capas de células de cúmulo.**





**Fotografía N° 14 y 15: Ovocitos maduros con células de cúmulo expandidos**



**Anexo 01: Clasificación de los ovocitos**

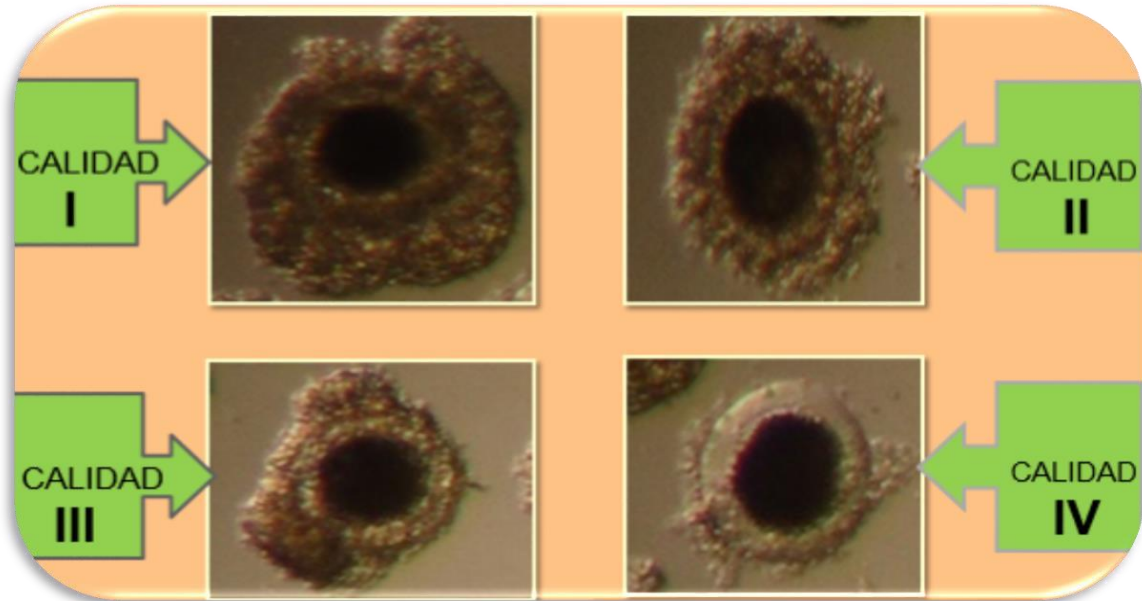
**Cuadro N° 11. Clasificación de ovocitos de Alpacas (Ratto, 2005)**

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

**Cuadro N° 12. Clasificación de CCOs de Bovinos (E. Mellisho, 2010)**

Categoría	Calidad	Características evaluadas
I	Bueno	Completamente rodeados por $\geq 3$ capas células del cúmulo con citoplasma homogéneo, eventualmente granulado
II	Regular	Ovocitos rodeados con $< 3$ capas de células del cúmulo y citoplasma generalmente homogéneo
III	Malo	Ovocitos desnudos y citoplasma con apariencia irregular con zonas oscuras
IV	Degenerado	Ovocitos con cúmulo expandido y/o citoplasma irregular.

Gráfico N° 06: Clasificación de ovocitos



Anexo N° 02: Medios utilizados en la fertilización *in vitro*

Cuadro N° 13: Preparación de la solución salina fisiológica 0.9% para 1Litro

NaCl	9g
Agua destilada	1000ml
Gentamicina	1ml

Cuadro N° 14: Medio de Manipulación

Ingredientes	100ml
TCM-HEPES	90ml
SFB	10ml
Gentamicina	100ul

Cuadro N° 15: Medio de Maduración

Ingredientes	10ml
TCM-199	9ml
SFB	1ml
Piruvato	60ul
FSH-LH	50ul
Glutamina	20ul
Estradiol	10ul

Gentamicina	10ul
-------------	------

**Cuadro N° 16: Medio de Fertilización**

<b>Ingredientes</b>	<b>10ml</b>
TALP-FIV (BASE)	10ml
Piruvato	100ul
Heparina	100ul
Gentamicina	10ul
BSA-FAF	30mg

**Cuadro N° 17: Medio cultivo SOF**

<b>Ingredientes</b>	<b>100ml</b>
SOF- BASE	100ml
Piruvato	400ul
Glutamina	200ul
Aminoácidos esenciales	2000ul
Aminoácidos no esenciales	1000ul
Ácido cítrico	100ul
Myoinositol	1000ul
SFB	2000ul
Gentamicina	100ul
BSA-FAF	0,3g

**Anexo N° 3: SOLUCIONES STOCK NECESARIAS PARA LA PREPARACION DE LOS DIFERENTES MEDIOS**

**Cuadro N° 18: Glutamina**

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

**Cuadro N° 19: Piruvato**

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

**Cuadro N° 20: Myoinositol**

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

**Cuadro N° 21: Fb-Estradiol**

FB-Estradiol	222 mg
Agua miliQ	10 ml

Separar en alícuotas de 30 ul y congelar a 4°C.

**Cuadro N° 22: Ácido Cítrico**

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

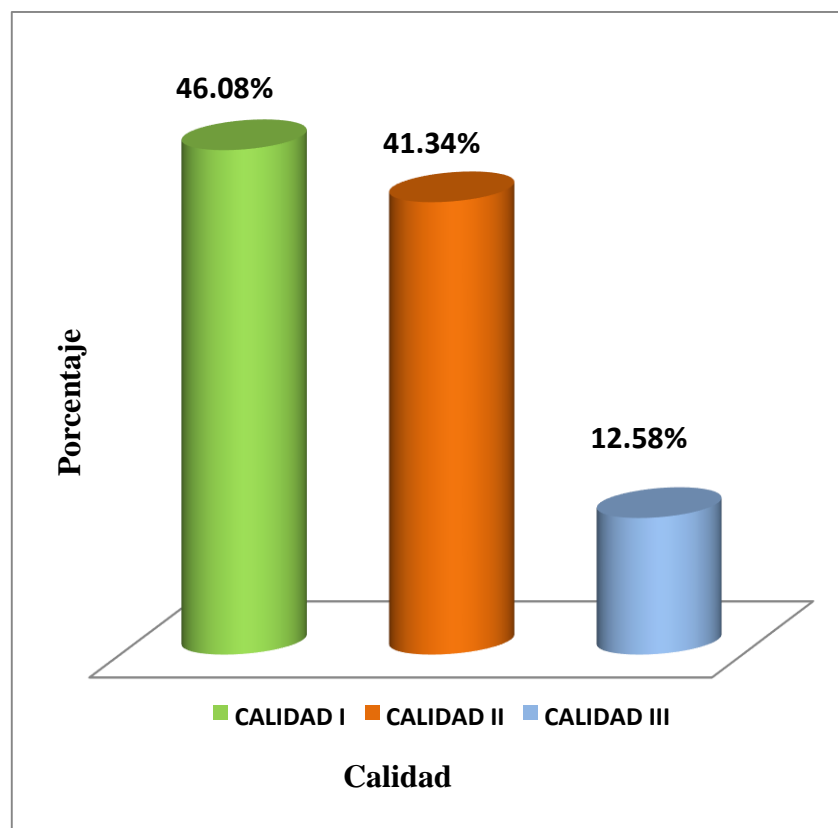
**Cuadro N° 23: FSH-LH**

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

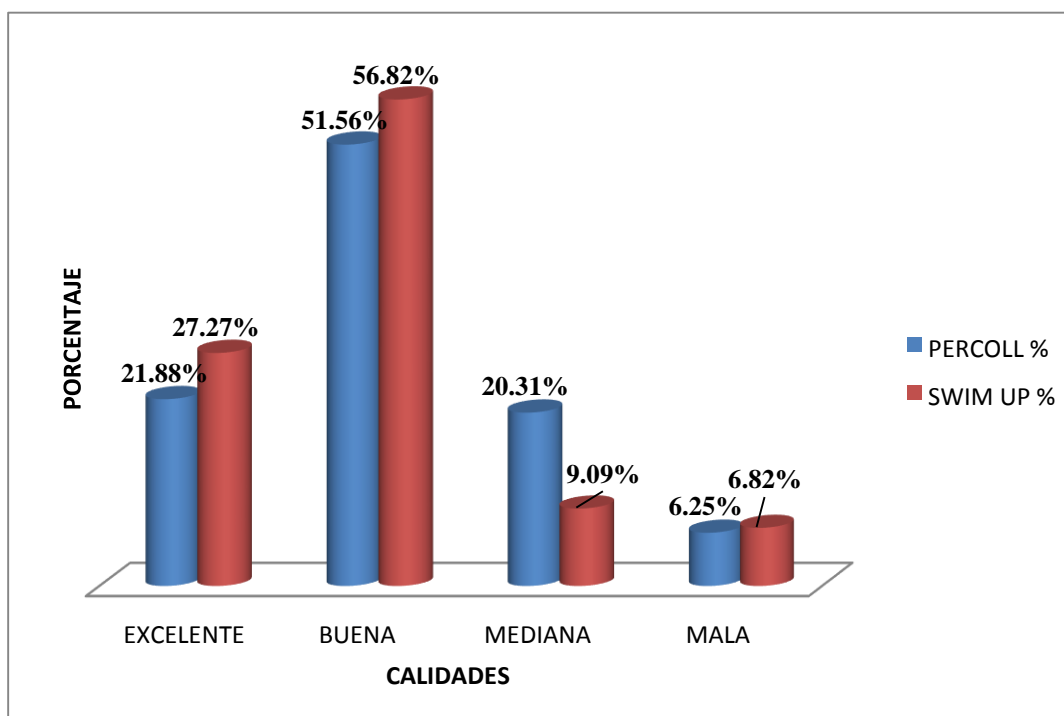
**Cuadro N° 24: Aceite Mineral**

Solución salina	150ml
Aceite mineral	350ml
Agitar la mezcla y dejarlo en la incubadora indefinidamente.	

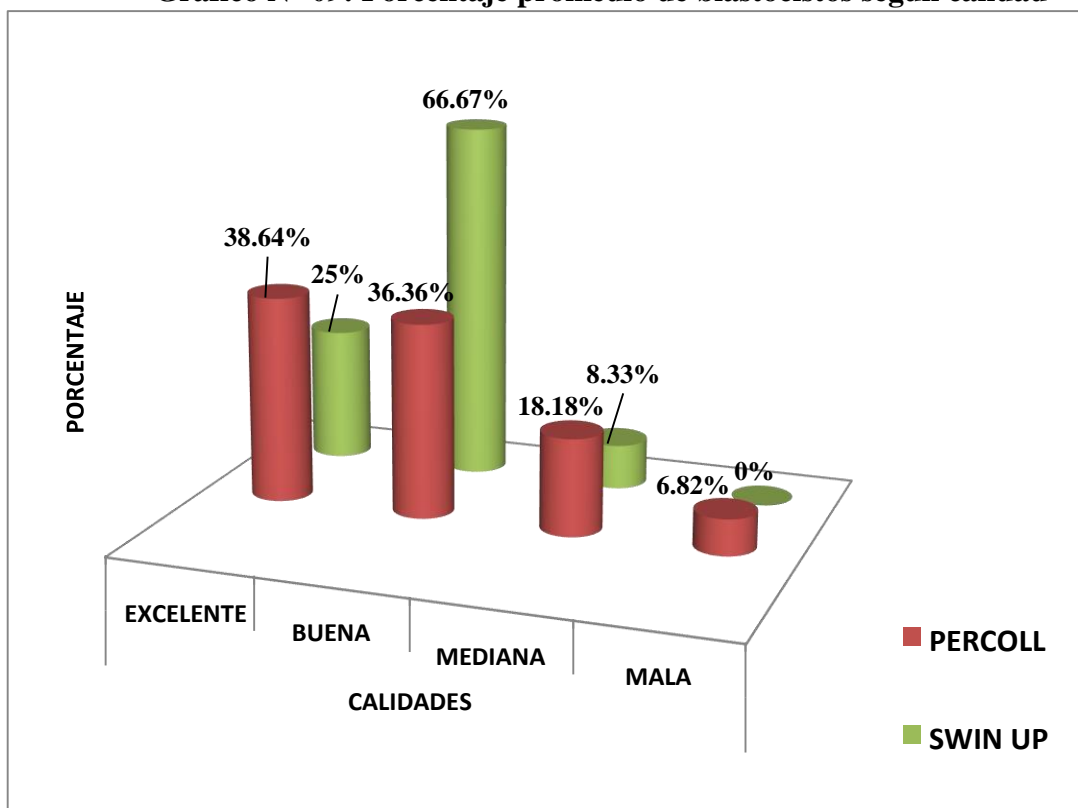
**Gráfico N° 07: Categorización morfológica de ovocitos colectados de alpaca (*Vicugna pacos*) Camal Municipal de Pilpichaca.**



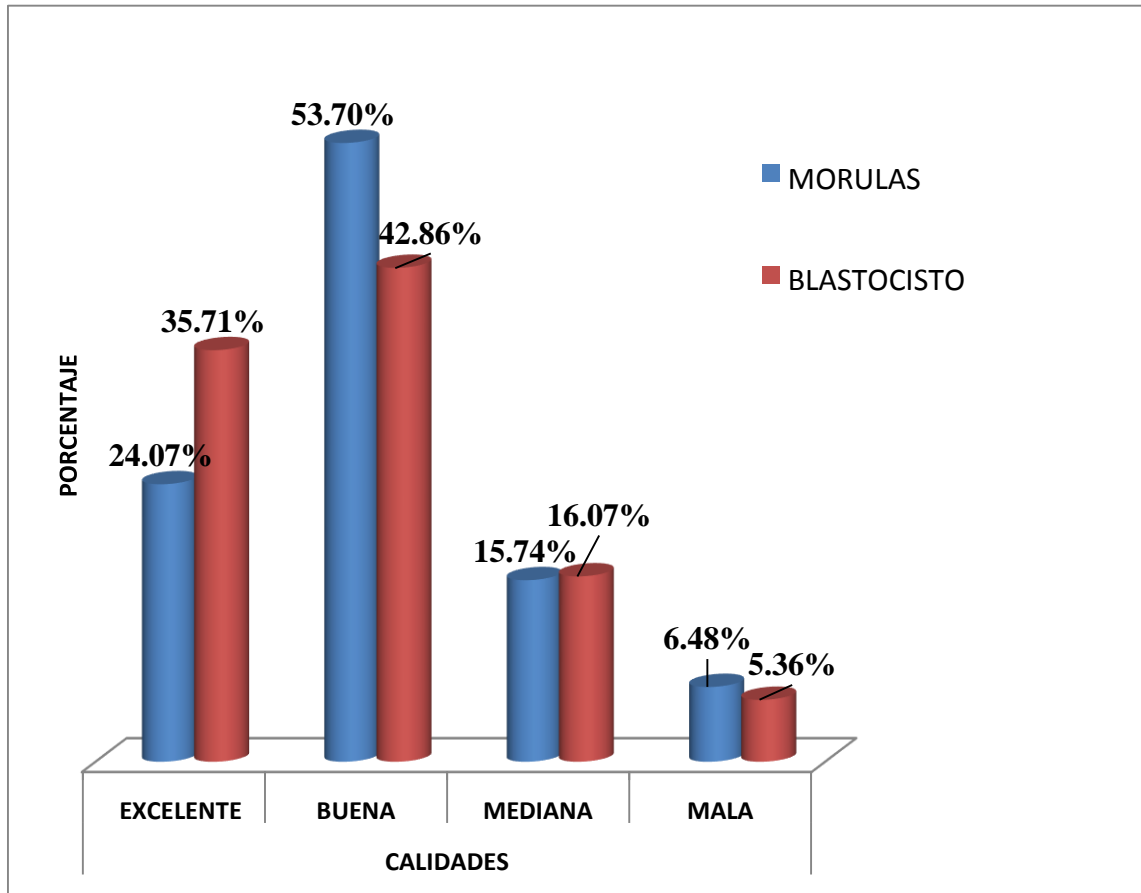
**Gráfico N° 08: Porcentaje promedio de mórulas obtenidas según calidad con dos métodos de capacitación espermática ( Percoll y Swim up)**



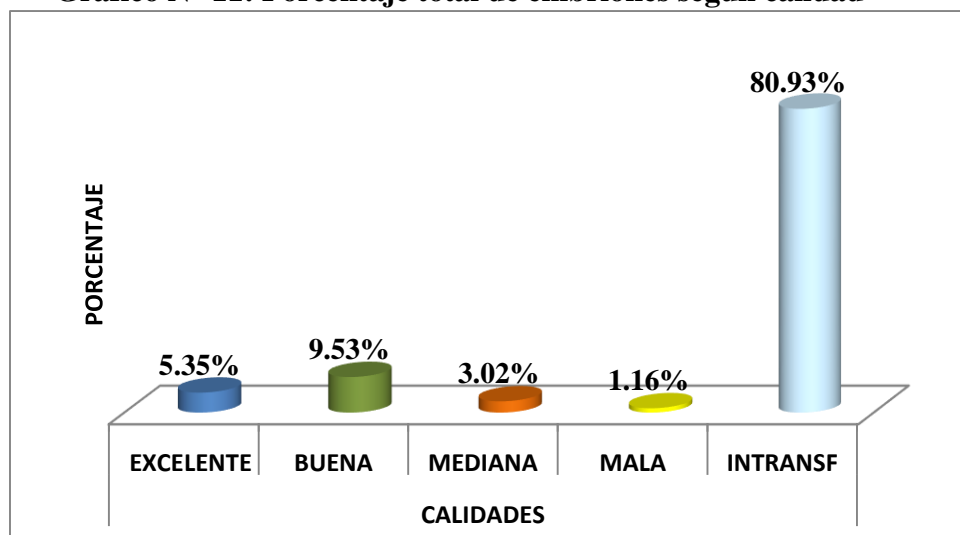
**Gráfico N° 09: Porcentaje promedio de blastocistos según calidad**



**Gráfico N° 10: Porcentaje total de mórulas y blastocistos según calidad de alpaca (*Vicugna pacos*)**

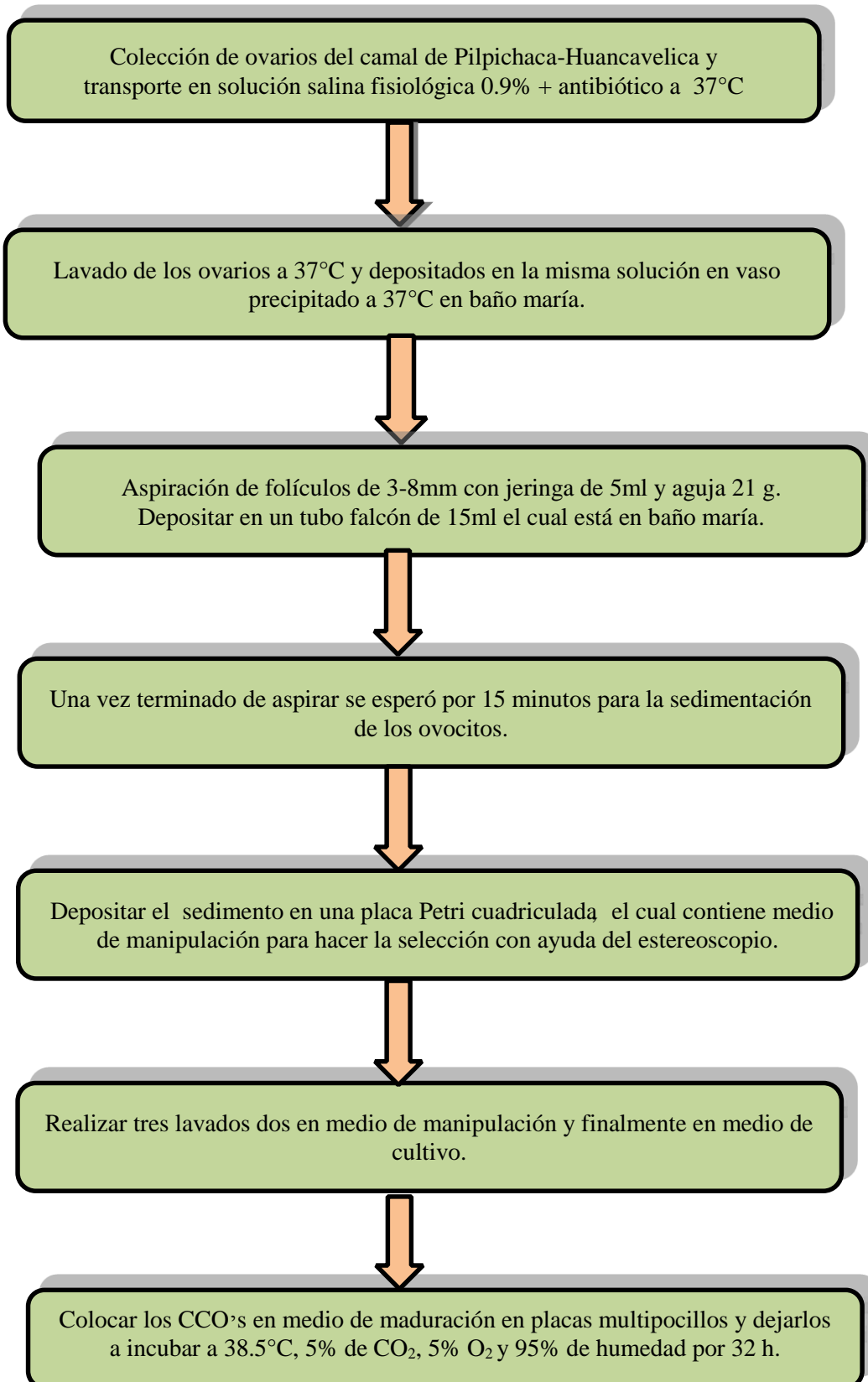


**Grafico N° 11: Porcentaje total de embriones según calidad**

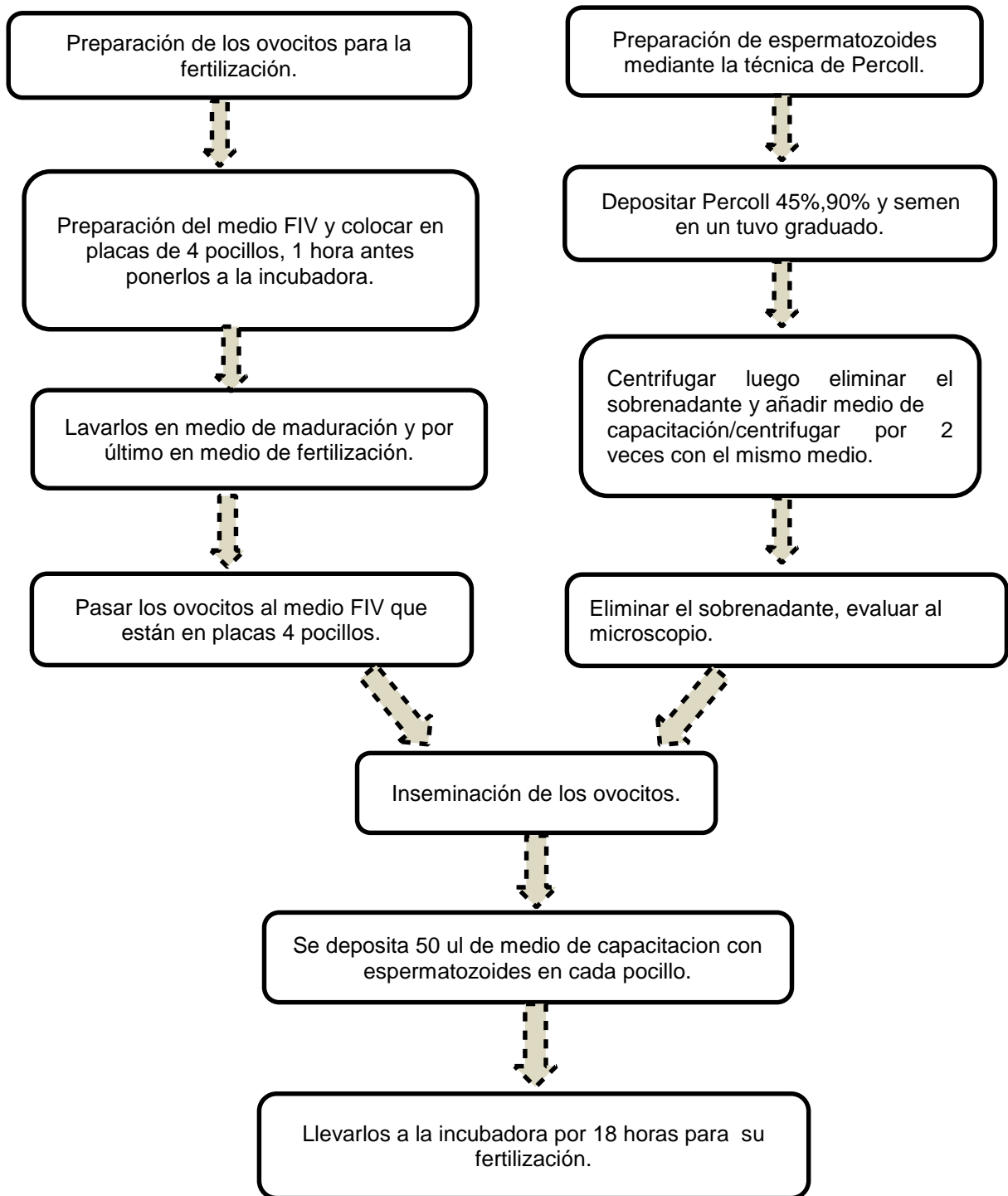


**Anexo N° 04: Resumen del flujo de la producción *in vitro* de embriones.**

**Gráfico N° 12: Flujo de maduración *in vitro* de ovocitos en alpaca**

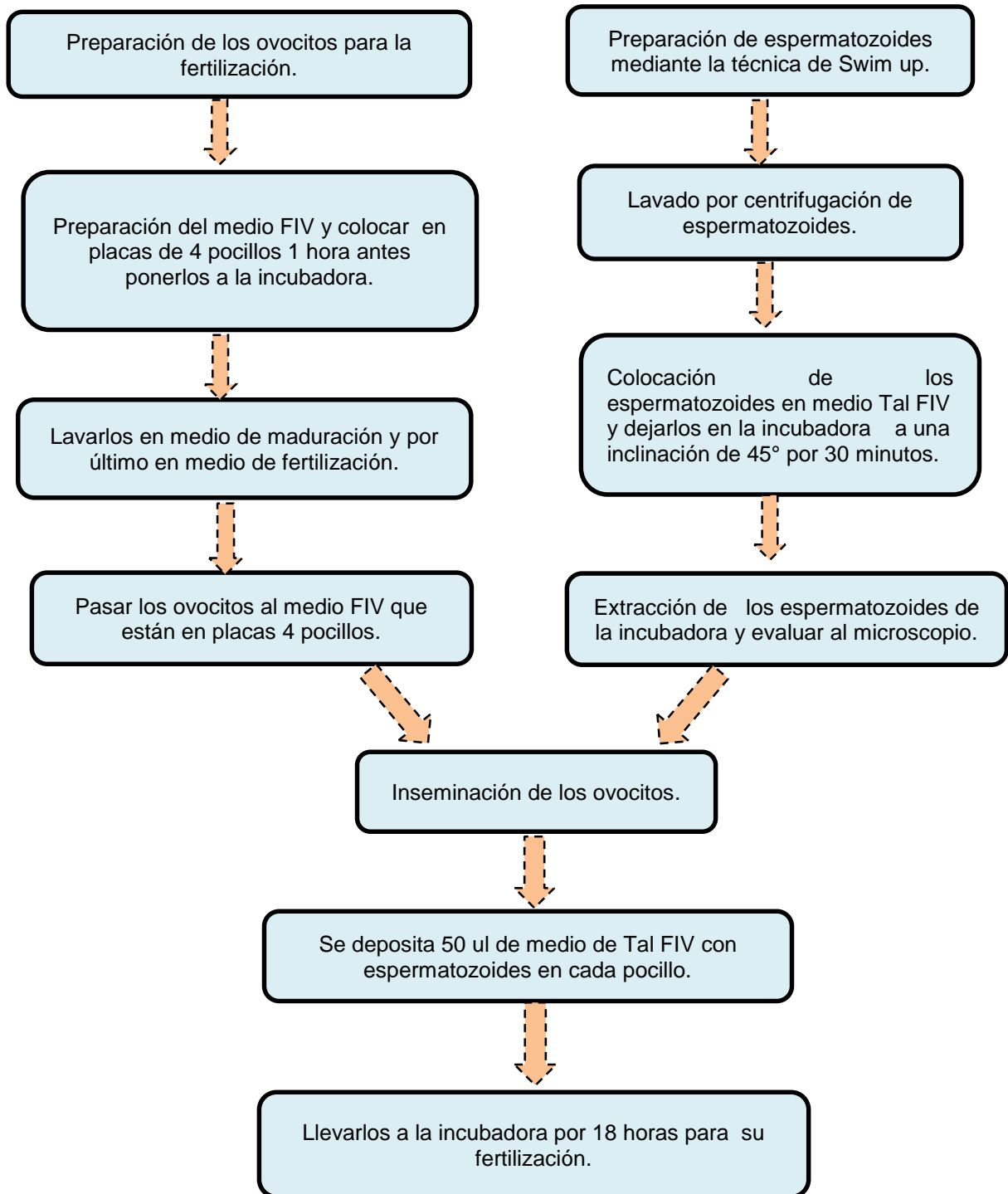


**Gráfico N° 13 Flujo de fertilización *in vitro* en alpacas (percoll).**

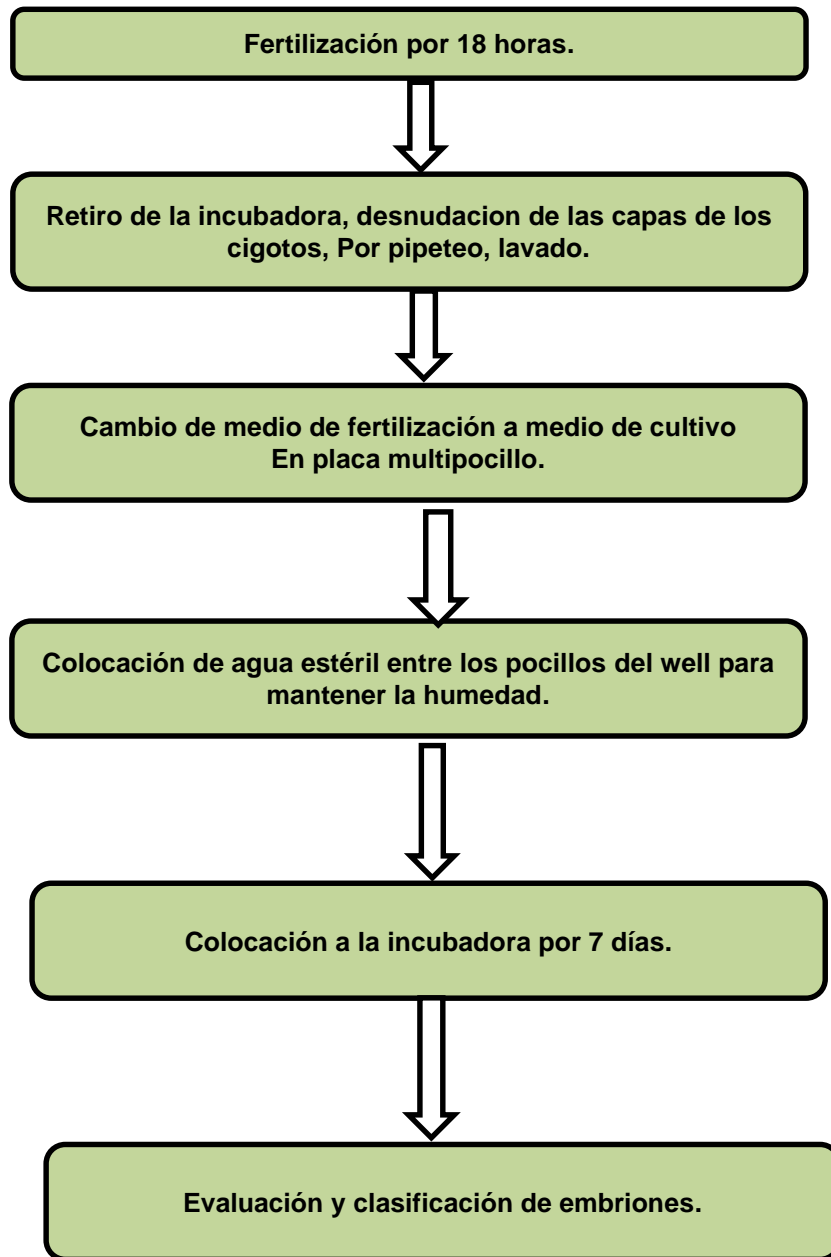




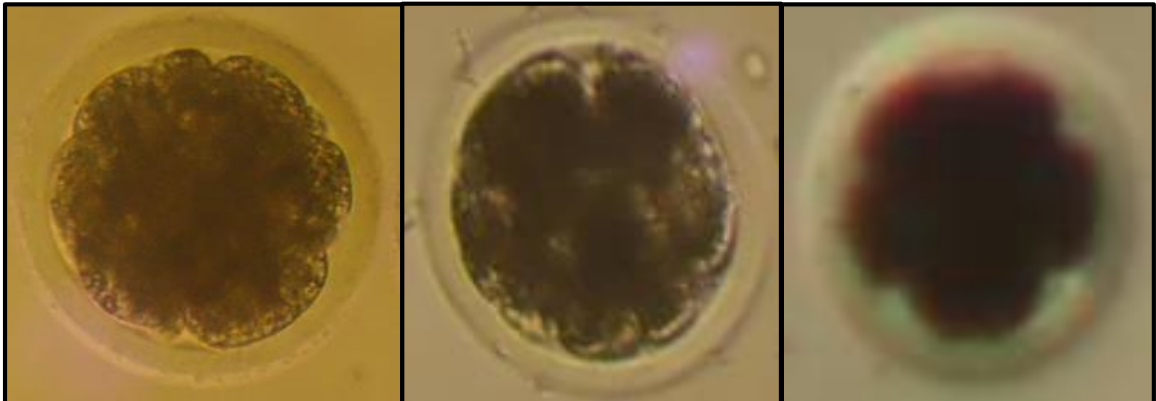
**Grafico N° 14 Flujo de fertilización *in vitro* en alpacas (Swim up)**



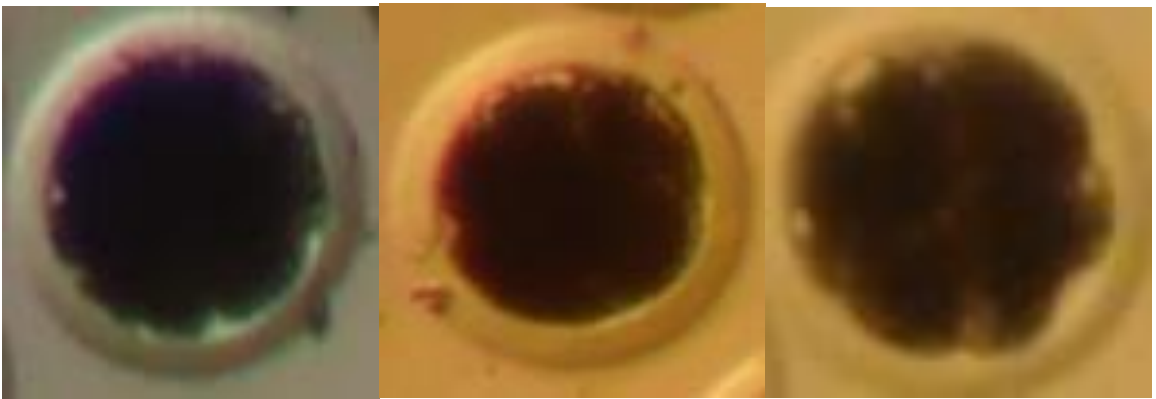
**Gráfico N° 15 Flujo de cultivo *in vitro* de ovocitos de alpacas.**



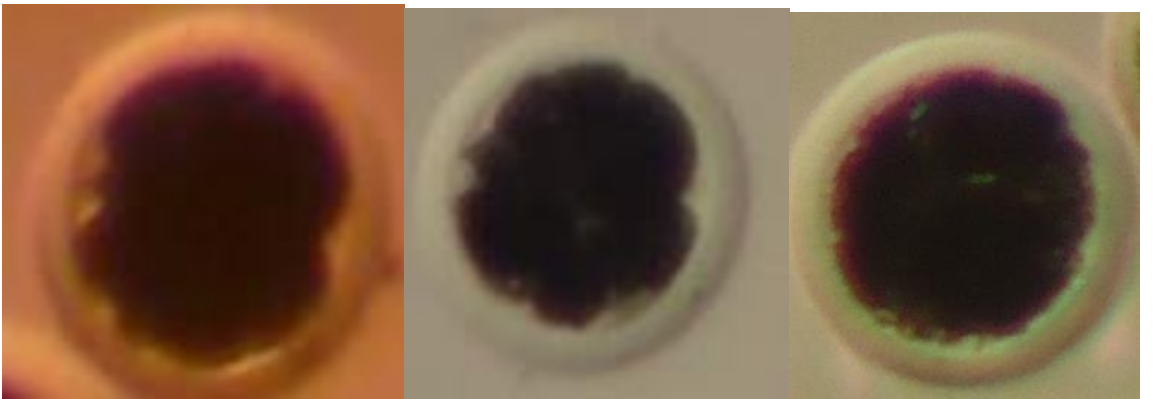
**Anexo N° 05**  
**Fotografía N°16: Mórulas (mórula temprana)**  
Calidad I



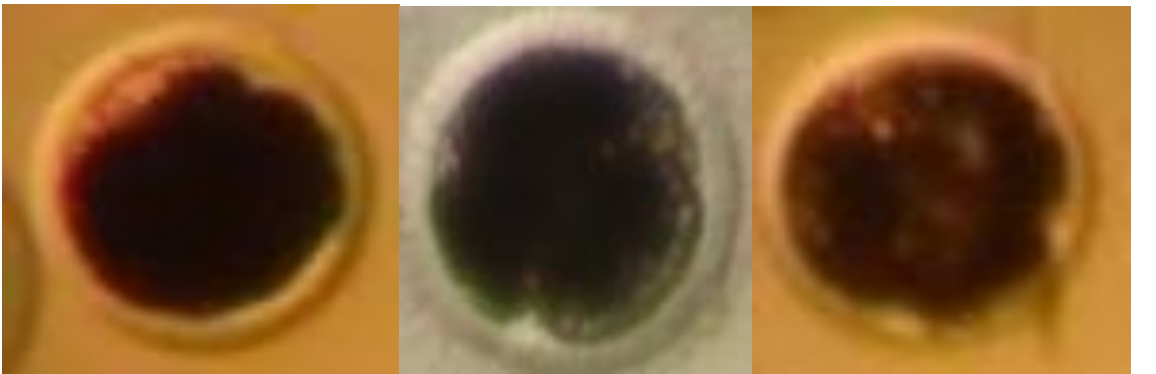
Calidad II



Calidad III

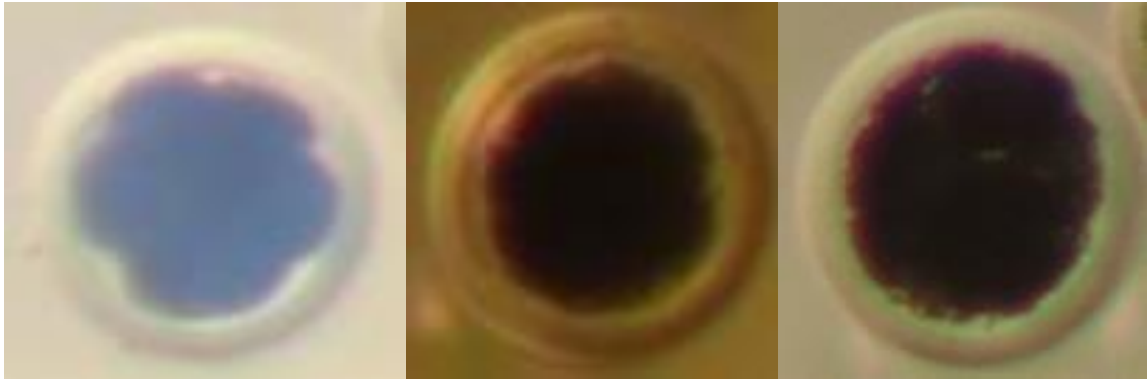


Calidad IV

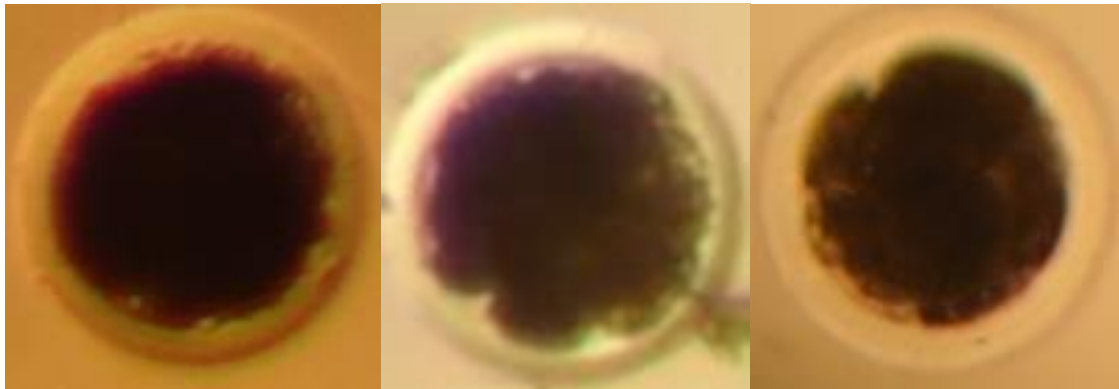


Mórulas tempranas según calidad

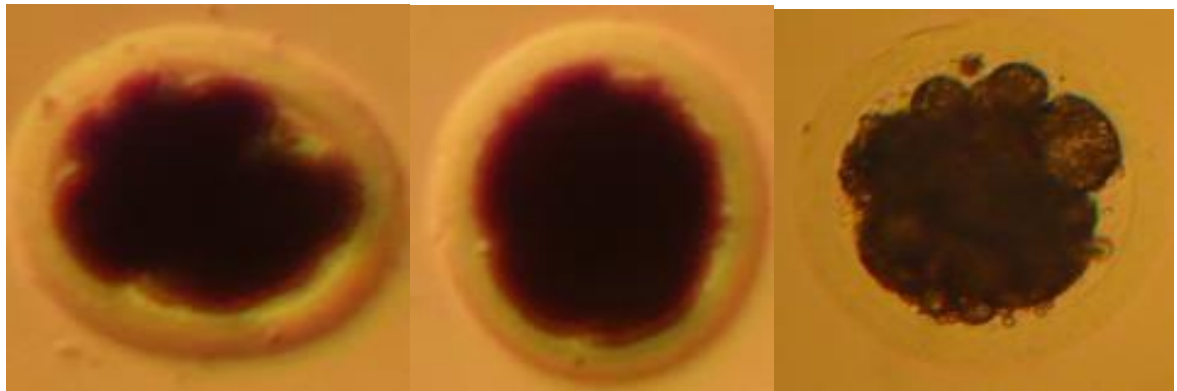
**Fotografía N°17: Mórula Compacta**  
Calidad I



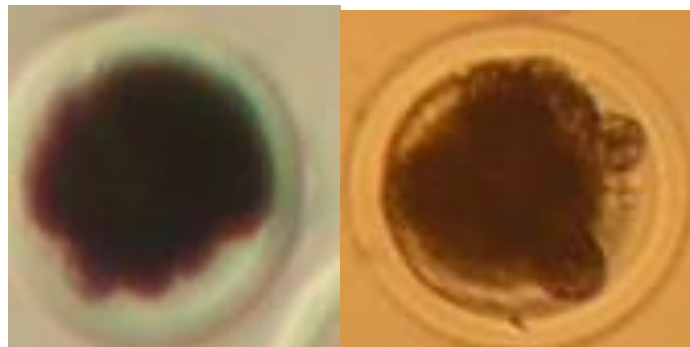
Calidad II



Calidad III

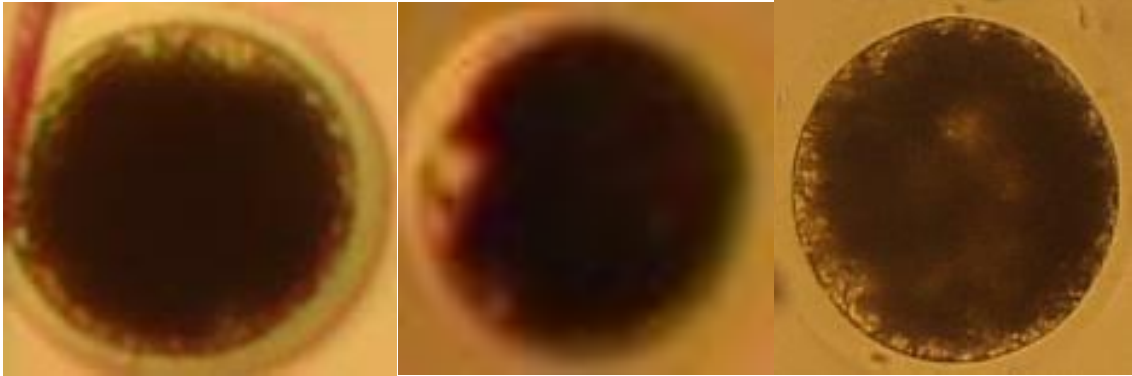


Calidad IV

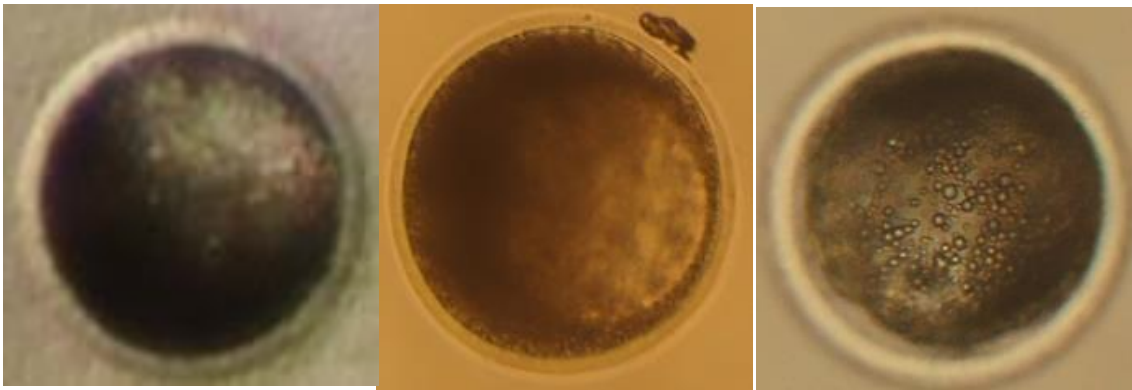


Mórulas compactas según calidad

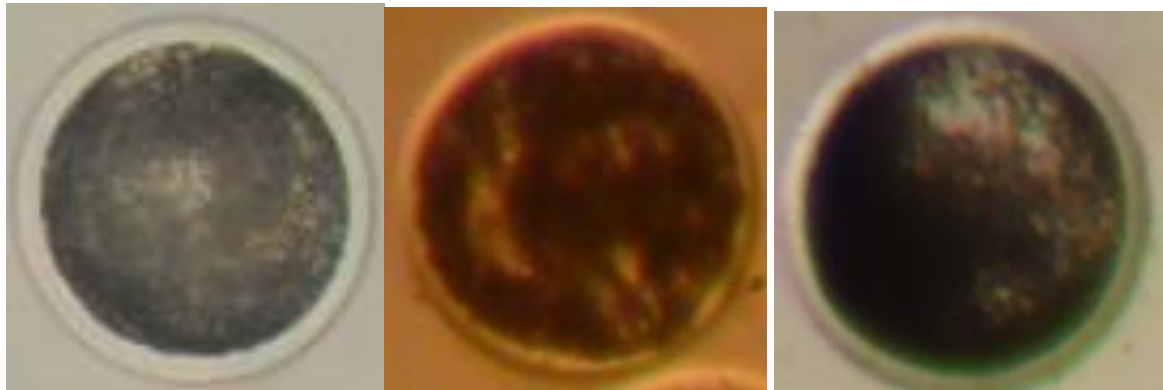
**Fotografía N°18: Blastocistos**  
Blastocistos tempranos



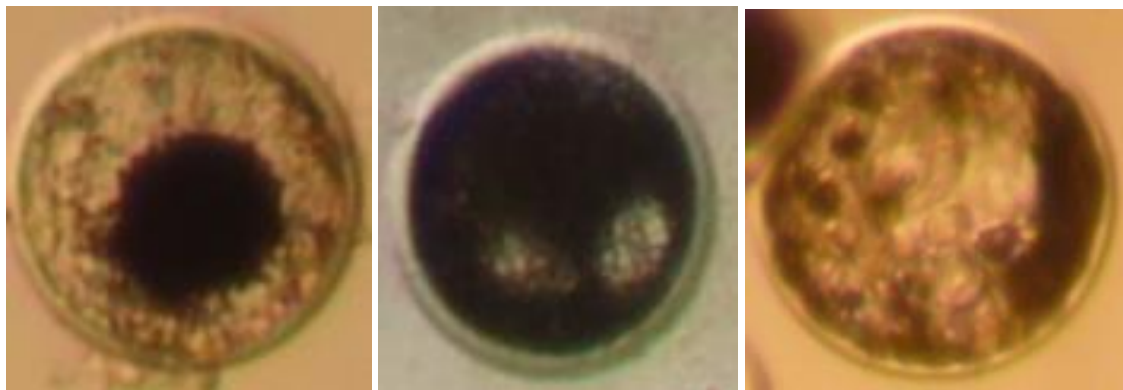
Blastocistos expandidos  
Calidad I



Calidad II

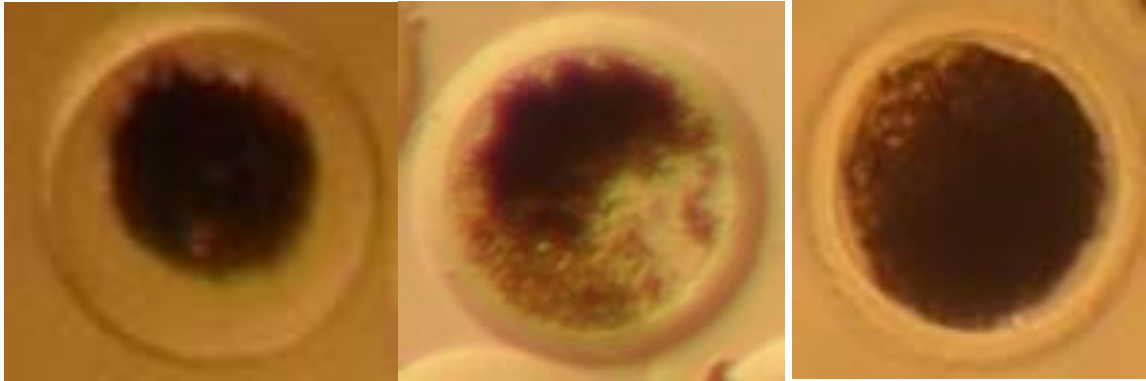


Blastocistos de calidad III

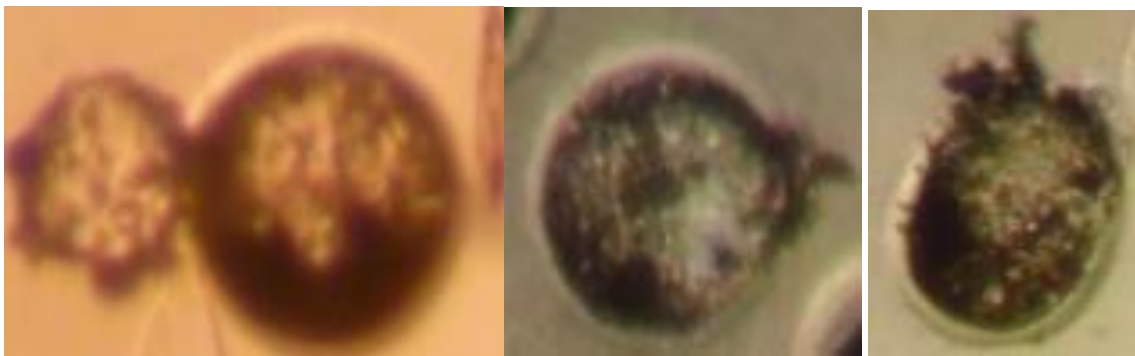
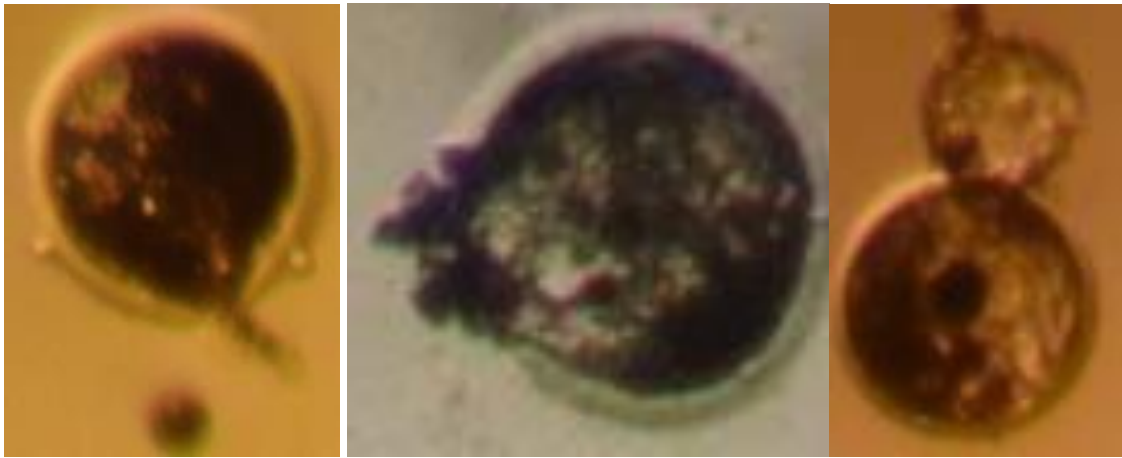


Blastocistos compacto según calidad

Blastocistos de calidad IV



Blastocistos protruido



Blastocistos eclosionados según calidad

## Anexo N° 06: Materiales



Fotografía 19: Incubadora de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> y balón de CO<sub>2</sub>



Fotografía 20: Cámara de flujo laminar



Fotografía 21: Refrigeradora para conservación De medios



fotografía 22: Autoclave



Fotografía 23: Centrifuga



Fotografía 24: Vortex genie



Fotografía 25: Balanza analítica



Fotografía 26: Estereoscopio



Fotografía 27: Platina térmica Neovet.



Fotografía 28: Selladora eléctrica

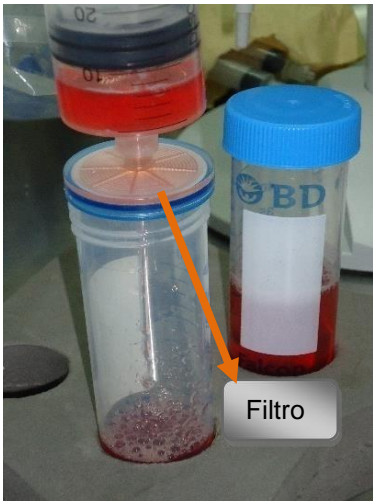




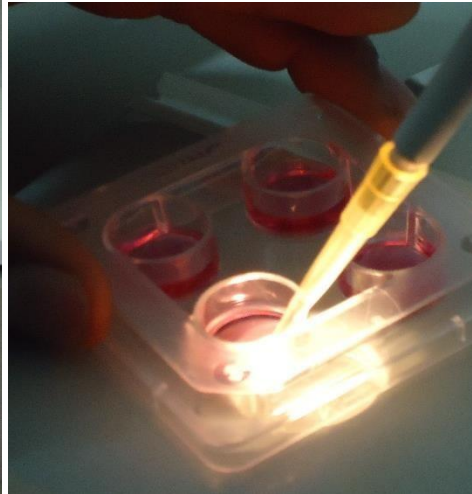
Fotografía 29. Componente de los medios de Cultivo (sales y stok de trabajo)



Fotografía 30. Preparación de medios



Fotografía 31: Tubos falcón



Fotografía 32: Placa multipocillo

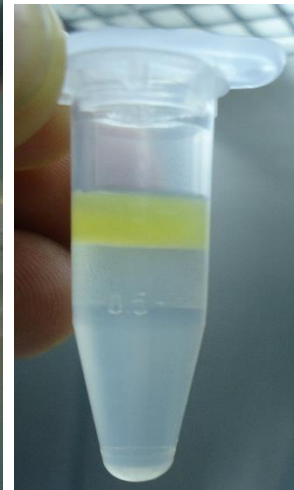


Grafico N°33 técnica percoll



Fotografía 34: Vaso Precipitado con ovarios

Fotografía 35: Baño María atemperada

**Anexo N° 07: Análisis estadístico de calidad de embriones**

**Cuadro N° 25: Promedio de ovocitos fertilizados por ovario, según tratamiento de alpaca (*Vicugna pacos*)**

Tratamiento	n	Promedio ± E.E.	Mínimo	Máximo
Percoll	6	3.43 ± 1.11 <sup>a</sup>	1.43	8.82
Swim up	6	2.28 ± 0.28 <sup>a</sup>	1.68	3.52

<sup>a</sup> Literales similares en la misma columna indican que no hay diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ).

**Cuadro N° 26: Porcentaje promedio de mórulas, según tratamiento de alpaca (*Vicugna pacos*)**

Tratamiento	N	Promedio ± E.E.	Mínimo	Máximo
Percoll	5	15.80 ± 6.86 <sup>a</sup>	5.36	22.78
Swim up	6	11.54 ± 5.79 <sup>a</sup>	7.04	22.09

<sup>a</sup> Literales similares en la misma columna indican que no hay diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ).

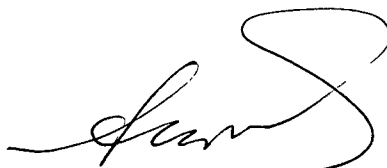
**Cuadro N° 27: Porcentaje de promedio blastocistos, según tratamiento de alpaca (*Vicugna pacos*)**

Tratamiento	n	Promedio ± E.E.	Mínimo	Máximo
Percoll	6	8.43 ± 6.04 <sup>a</sup>	3.51	16.46
Swim up	5	3.89 ± 1.75 <sup>a</sup>	1.89	5.81

<sup>a</sup> Literales similares en la misma columna indican que no hay diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ).

**“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE EMBRIONES PRODUCIDOS POR  
FERTILIZACIÓN IN VITRO EN ALPACAS (*Vicugna pacos*)”**

**Recomendado** : 26 de agosto de 2014  
**Aprobado** : 19 de setiembre de 2014



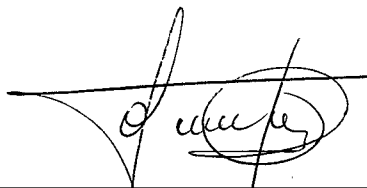
---

**M. V. ALFREDO SALVADOR CÓRDOVA LÓPEZ**  
**Presidente del Jurado**



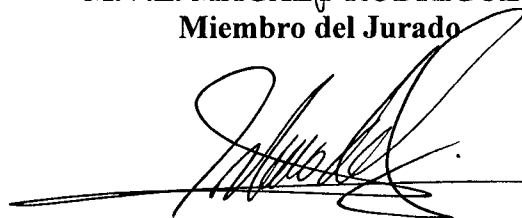
---

**M. Sc. CÉSAR AUGUSTO OLAGUIVEL FLORES**  
**Miembro del Jurado**



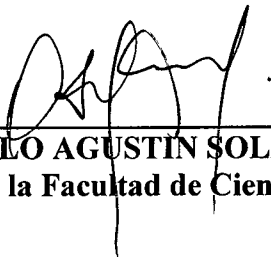
---

**M.V.Z. MAGALY RODRÍGUEZ MONJE**  
**Miembro del Jurado**



---

**Dr. LUIS ARTURO RODRÍGUEZ ZAMORA**  
**Miembro del Jurado**



---

**Dr. ROMULO AGUSTIN SOLANO RAMOS**  
**Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias**