

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Tiempo de maduración de ovocitos de *Vicugna pacos*
"alpaca" en el desarrollo embrionario por
fecundación *in vitro*, Huancavelica 2011.**

Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo en la
Especialidad de Biotecnología

Presentado por:

Bach. Paulo Cesar SANTAYANA RENGIFO

**AYACUCHO – PERÚ
2012**

A Dios, por darme la inteligencia,
sabiduría y perseverancia.

A mis Padres Edgar y Betssi, por ser
los pilares incondicionales en mi
vida y ser ejemplo de amor, respeto
y dedicación.

A ustedes hermanos José Eduardo,
Rocío del Pilar y Edgar Gabriel, y a
mi hermosa familia, por su apoyo
incondicional y cariño.

AGRADECIMIENTOS

Mediante estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que han confiado alguna vez en mí y han hecho posible la realización de esta tesis que ahora acaba y que ha supuesto una etapa muy importante en mi vida, tanto en lo profesional como en lo personal.

En primer lugar, agradecer a ti Dios por amarme y darme todo en la vida, gracias por estar a mi lado a cada instante, por ser mi fortaleza y la luz que guía mi camino.

A la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, mi *Alma mater*, por brindarme los más grandes conocimientos en mi formación profesional, forjándome como hombre de ciencias al servicio de la sociedad.

Al Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica, por permitirme la utilización de sus instalaciones, equipos y materiales durante la fase experimental de mi tesis.

A mis asesores, Dr. Jaime Antonio Ruiz Béjar y Mg. Fidel Rodolfo Mujica Lengua por su amistad, paciencia, apoyo, confianza, valía y su gran ayuda, sin los cuales la conclusión de este trabajo no hubiera sido posible.

A mi gran amigo José Luis Mendoza Mallma por su inestimable enseñanza y colaboración.

A la Ing. Leandra Landeo Jurado, por su apoyo y colaboración en el asesoramiento estadístico.

A mis compañeros de laboratorio; Duriel, Sugar, Isella, Marilyn, Indira, por su apoyo prestado, amistad, amabilidad y por el buen ambiente de trabajo durante todo el tiempo de estadía en el laboratorio.

A los trabajadores del Camal Municipal de Huancavelica, Dra. Delia Foroca Mamani, Ing. Richar Ancassi Requena, señores(as) menudencieras, por su paciencia y apoyo en la obtención del material biológico.

A mi familia, por su comprensión y ayuda en los momentos buenos y malos. Muy especialmente a mis padres, por brindarme todo su apoyo, sus consejos, su esfuerzo y dedicación, de lo cual estoy infinitamente agradecido.

A mis amigos de toda la vida, por sus constantes palabras de aliento, que fueron la fuerza para seguir adelante y culminar con este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. GENERALIDADES	3
2.1.1. Ovocito	3
2.1.2. Ovogénesis	4
2.1.3. Maduración de ovocitos	5
2.1.4. Obtención de ovarios y ovocitos	8
2.1.5. Selección y clasificación de ovocitos	9
2.1.6. Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	10
2.1.7. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV)	19
2.1.8. Sistema de cultivo <i>in vitro</i> de embriones	23
2.2. ANTECEDENTES	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Localización de la zona de investigación y muestreo	27
3.2. Población y muestra	27
3.3. Maduración <i>in vitro</i>	28
3.3.1. Obtención de ovarios	28
3.3.2. Recuperación de ovocitos	28
3.3.3. Maduración de ovocitos seleccionados	29
3.3.4. Evaluación del estado nuclear de los ovocitos	29
3.4. Fecundación <i>in vitro</i>	31
3.4.1. Recuperación y selección de espermatozoides	31
3.4.2. Preparación de los ovocitos	32
3.4.3. Fertilización de ovocitos	32
3.5. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones	32
3.6. Evaluación de los resultados	33
3.6.1. Clasificación de ovocitos	33
3.6.2. Evaluación del estado nuclear de los ovocitos	33
3.6.3. Evaluación del desarrollo embrionario	35
3.7. Diseño estadístico	36
IV. RESULTADOS	37
V. DISCUSIONES	63
VI. CONCLUSIÓN	73
VII. RECOMENDACIONES	74
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXO	92

Tiempo de maduración de ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca" en el desarrollo embrionario por fecundación *in vitro*, Huancavelica, 2011

Autor : Paulo Cesar Santayana Rengifo
Asesores : Mg. Fidel Rodolfo Mujica Lengua
Dr. Jaime Antonio Ruiz Béjar

RESUMEN

Con el objetivo de determinar el tiempo óptimo de maduración nuclear *in vitro* de ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca" y evaluar la influencia de éste sobre el desarrollo embrionario post-fecundación *in vitro*, se utilizaron ovocitos de categoría I y II obtenidos por aspiración folicular de ovarios de alpacas sacrificadas en el Camal Municipal de Huancavelica, éstos fueron madurados en medio TCM-199 suplementado con HEPES 25mM, Piruvato de sodio 0.2 mM, Sulfato de gentamicina 50 µg/ml, FSH 0.02 unidades/ml, Estradiol 17-β 1 µg/ml y Suero Fetal Bovino al 10%, e incubados a 38.5°C en una atmósfera de aire estéril con 5% CO₂ y 90% de humedad por espacio de 24, 28 y 32 h. Transcurrido estos tiempos, los ovocitos fueron retirados del medio y sumergidos en una solución de Hialuronidasa al 0.1% para ser despojados de las células del cúmulo. Los ovocitos fueron fijados en una solución de metanol: ácido acético (3:1) y teñidos con orseina acética al 1% para evaluar el estadio de maduración nuclear (Vesícula Germinal-VG, Vesícula Germinal Rota-GVBD, Metafase I-MI, Metafase II-MII). Luego, se realizó la fecundación *in vitro* y se evaluó el desarrollo embrionario, para lo cual se procedió a madurar los ovocitos del mismo modo que en el ensayo anterior, conservando los tiempos de 24, 28 y 32 h. Se recuperaron espermatozoides epididimarios en medio Sperm-TALP para luego ser lavados y seleccionados mediante la técnica de Swim-up, se utilizó una concentración promedio de 1.5-2x10⁶ espermatozoides/ml para inseminar los ovocitos. Transcurridas las 18 h de fecundación, los presuntos cigotos fueron transferidos al medio mSOF-IVC e incubados por 7 días a 38.5°C, en una atmósfera de aire estéril con 5% CO₂ y 90% de humedad. Los resultados obtenidos muestran que el mayor porcentaje de maduración nuclear (ovocitos en estadio de metafase II- Mii) fue alcanzado a las 32 h de cultivo *in vitro* con un 65.08%, seguida por el de 28 h con un 50.33% y finalmente el de 24 h con un 46.33%. Por otra parte, en cuanto a los resultados del desarrollo embrionario, se notó que los porcentajes de segmentación y blastocistos, aumentaron gradualmente hacia el mayor tiempo de maduración, siendo el de 32 h el tiempo con el mayor índice de desarrollo alcanzado, con un 60.17% y 17.02% para los estadios de segmentación y blastocisto respectivamente. Se concluye que el tiempo óptimo para la maduración nuclear y la adquisición máxima de la capacidad de desarrollo embrionario *in vitro*, de ovocitos de alpaca, fue de 32 h, bajo las condiciones del presente estudio.

Palabras claves: Ovocitos, Maduración *in vitro*, Metafase II, Fecundación *in vitro*, embriones, alpaca.

I. INTRODUCCIÓN

La crianza de los Camélidos Sudamericanos, es una de las actividades de mayor importancia e impacto en el desarrollo socio económico de la población alto andina de nuestro país, no sólo por su capacidad de adaptación a las difíciles condiciones medioambientales, alturas entre los 3,000 a 5,000 msnm, sino por su utilización como una fuente alimenticia de proteína de origen animal, medio de transporte y como recurso para la producción de fibra de buena calidad (Huanca y col., 2007).

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

Pese a esta situación problemática, la aplicación de biotecnologías reproductivas podría contribuir rápidamente a superar estos bajos índices reproductivos logrando la multiplicación de animales de alto valor productivo, formando núcleos

genéticos que puedan proveer reproductores para los criadores de estos animales, y darles más sustento económico (Ruiz, 2009).

Una de estas tecnologías que hoy en día se están aplicando en Camélidos Sudamericanos, es la fecundación *in vitro* (FIV); sin embargo, esta se encuentra en estado formativo, requiriendo de mayor investigación para su total desarrollo. Esto motivó a poder realizar una investigación sobre un tema específico y muy importante, referido al tiempo óptimo requerido para la maduración nuclear *in vitro* de ovocitos.

Un tiempo inapropiado de maduración puede permitir la formación anormal de la cromatina (Donnay y col., 1998), el envejecimiento del ovocito (Hunter y Greve, 1997) o una limitación para alcanzar con éxito las fases de fecundación, división y desarrollo embrionario (Eppig y col., 1994). Esta diferenciación de los ovocitos es orquestada por una interacción compleja entre factores de crecimiento y citoquinas que permiten la maduración nuclear y citoplasmática (Blondin y Sirard, 1995; Boelhauve y col., 2005).

El objetivo del presente trabajo fue determinar el tiempo óptimo (24, 28 y 32 h) de maduración nuclear *in vitro* de ovocitos de alpaca y evaluar la influencia de éste sobre el desarrollo embrionario luego de fecundación *in vitro*, datos que aún son desconocidos para la ciencia e importantes para el avance de la biotecnología reproductiva en Camélidos Sudamericanos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. GENERALIDADES

2.1.1. Ovocito

En organismos animales, los gametos proceden de una estirpe celular específica llamada línea germinal que da lugar a las células germinales primordiales y que en etapas tempranas del desarrollo se diferencian y originan ovocitos y espermatozoides. Los ovocitos de mamíferos se encuentran rodeados de varias capas de células que constituyen el cúmulo oóforo (células del cúmulo) (Díaz y col., 2007). La parte más interna de la capa de células se denomina corona radiada, formada por células de la granulosa, que se comunica con el ovocito a través de uniones intercelulares "gap" (Gilula y col., 1978). Estas conexiones celulares permiten el intercambio de moléculas entre el ovocito, las células de la granulosa y la circulación sanguínea, con finalidad nutritiva y reguladora, conocido como "cooperación metabólica", de forma que las células somáticas proporcionan nucleósidos, aminoácidos y fosfolípidos, además de mantener un balance iónico y una estabilidad en el RNA mensajero en el ovocito (Apa y col., 1994; Hunter, 2000).

Las cubiertas ovocitarias constituyen una peculiaridad de los ovocitos. La cubierta principal es la zona pelúcida (ZP), una capa adyacente a la membrana

plasmática (Conner y col., 2005), que es una especialización de la matriz extracelular de 8-10 μ m de espesor formada fundamentalmente por glicoproteínas, algunas de las cuales son secretadas por el óvulo y otras por las células granulares (Litscher y Wassarman, 2007). La importancia de la ZP en mamíferos radica en que está implicada en la unión específica espermatozoide-ovocito, la inducción de la reacción acrosómica y el bloqueo de la polispermia gracias a los receptores espermáticos presentes en su ultraestructura. Estos receptores impiden la unión de espermatozoides procedentes de especies heterólogas y facilitan la penetración de espermatozoides homólogos (Wassarman y Litscher, 2008).

2.1.2. Ovogénesis

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 éste 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 estado de folículos primordiales, sin signos aparentes de diferenciación, o con folículos en la fase de reclutamiento o maduración.

La formación de los ovarios es un evento temprano en el desarrollo embrionario que se produce en el endodermo del saco vitelino a partir de células germinales primordiales que emigran hasta la cresta gonadal antes de diferenciarse en ovocitos. Durante el desarrollo fetal las células germinales primordiales del ovario van a sufrir un proceso de diferenciación; inicialmente se transforman en ovogonias por sucesivas divisiones mitóticas, las cuales dan lugar a ovocitos primarios al iniciarse la primera división mitótica (Mehlmann y col., 2002). En las hembras, toda la población de ovocitos entra en 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 profase I (estadio

dictiatio). En este momento, el ovocito comienza a ser rodeado por células granulosas que forman una membrana basal alrededor de las mismas, generando el comportamiento folicular (Mehlmann, 2005). 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 al factor promotor de la maduración/meiosis (MPF) (Kalinowski y col., 2004).

Los ovocitos en estado latente en la profase I, presentan un núcleo prominente denominado vesícula germinal (VG) y están rodeados de una capa de células epiteliales (foliculares) no proliferativas conocidas como células pregranulosas, que están implicadas en el crecimiento folicular y en el mantenimiento de la inhibición de la meiosis del ovocito. El conjunto del ovocito primordial y la capa de células de la granulosa que lo rodean 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.

2.1.3. Maduración de ovocitos

La maduración del ovocito hace referencia a todos los cambios nucleares, citoplasmáticos y de membrana que sufre el ovocito, con el fin de prepararse para ser fecundado con éxito y desarrollarse posteriormente (Picton y col., 2008). Está bien documentado que la maduración es un proceso que requiere de la integración de una red de señalización endocrina, paracrina y autocrina que

implica la interacción directa entre el ovocito y las células granulares del cúmulo (Sun y col., 2009).

En el proceso de maduración los ovocitos detenidos en diploteno de la profase I se transforman en ovocitos secundarios que están detenidos en metafase de la segunda división meiótica (o metafase II), que corresponde al estadio en el que los ovocitos son ovulados y pueden ser fecundados. Los ovocitos en folículos primarios y preantrales son incompetentes meióticamente y, por tanto, no maduran espontáneamente si se extraen de sus folículos. Los ovocitos en el estadio antral temprano comienzan a crecer en respuesta a la Hormona Folículo Estimulante (FSH), obtienen competencia meiótica y pueden madurar si se les aísla de sus folículos (Tornell y col., 1990). Se ha descrito que con el crecimiento del folículo se desarrollan receptores de la Hormona Luteinizante (LH) en las células de la granulosa que permiten al ovocito reiniciar la meiosis tras el estímulo hormonal de LH, así como la ovulación del ovocito maduro (Mehlmann, 2005; Richards, 2002).

Desde el punto de vista molecular se puede distinguir la maduración nuclear y la citoplásmica. La maduración nuclear comprende toda una serie de procesos moleculares que permiten la salida de la profase I y la progresión hacia el estadio de metafase II (MII), con una nueva detención en éste estadio a la espera de la fecundación. La maduración nuclear se inicia con la disolución de la membrana nuclear, un proceso conocido como "rotura de la vesícula germinal" (del inglés: "germinal vesicle breakdown", GVBD). Con la llegada al estadio de metafase I se produce la segregación de los cromosomas homólogos, la posterior formación del primer corpúsculo polar y el paso del ovocito al estadio MII. La maduración nuclear finaliza cuando el ovocito completa la primera división meiótica, alcanzando el estadio MII unas 36-40 horas después del pico de LH, tras lo cual se produce la segunda detención de la meiosis (Peters, 2002).

La maduración citoplásmica se refiere a los procesos o mecanismos moleculares no directamente relacionados con la progresión de la meiosis que acompañan a la maduración nuclear y preparan al ovocito para su activación, la formación de los pronúcleos, la fecundación y el posterior desarrollo embrionario.

El estímulo inicial que desencadena la maduración del ovocito es el aumento preovulatorio de los niveles de gonadotropinas, en especial de la LH que además de reiniciar la meiosis, desencadena otras transformaciones dentro del folículo como las modificaciones en la esteroidogénesis folicular y cambios morfofuncionales en el Complejo ovocito-cúmulo (COCs) (Mounsey y col., 1999). El mecanismo de acción de las gonadotropinas FSH y LH en el reinicio meiótico del ovocito está mediado por el incremento de la generación de AMPc (Su y col., 2004; Zhang y col., 2007). Este aumento de AMPc activa la cascada de las MAP quinasas (MAPK), concretamente MAPK3/1 (más comúnmente conocidas como ERK1/2) en las células de la granulosa del cúmulo pero no en el ovocito donde la ruta de señalización de MAPK se ha relacionado con eventos implicados post-GVBD como es la organización del huso mitótico más que con el reinicio meiótico (Fan y Sun, 2004; Liang y col., 2007; Xiong y col., 2008; Yu y col., 2007). Sin embargo, los mecanismos concretos por los que AMPc activa MAPK en el ovocito son aún desconocidos (Zhang y col., 2009).

Es necesario que MPF se encuentre en forma activa para el comienzo de la maduración. Su actividad alcanza un máximo en metafase I y II, para decrecer posteriormente en anafase I y II (Kikuchi y col., 1995), lo que indica que su inactivación también es necesaria para la progresión de la maduración. Además, la reorganización de los microtúbulos y la apropiada orientación del huso acromático durante el estadio Metafase I están mediada por las MAPK cuya actividad también está inhibida de algún modo por el AMPc, aumentando su actividad con la entrada del ovocito en meiosis. Sin embargo, a diferencia del

MPF, la actividad MAPK permanece elevada en los estadios de anafase (Jones, 2005).

2.1.4. Obtención de ovarios y ovocitos

2.1.4.1. Obtención de los ovarios

Se consiguen de alpacas sacrificadas en matadero. Todos los autores están de acuerdo en que su 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 J., 2009; Ruiz y col., 2009; Sacha y Rojas, 2009). El transporte se hace en Soluciones Salinas Fisiológica (SSF) o Buffer Fosfato Salinas (PBS) con antibióticos (Ratto y col., 2005; Huanca y col., 2009). Por otro lado, el tiempo que transcurre, desde la colecta de los ovarios hasta el cultivo de los ovocitos, debe oscilar entre 2 y 5 h (Katska y Smorag, 1984; First y Parrish, 1988), aunque Yang y col., (1990), indican que después de ocho horas desde la colecta de los ovarios todavía se puede conseguir la maduración *in vitro*, siempre y cuando los ovarios se mantengan por encima de 24°C. Por otra parte, la edad óptima del animal para obtener ovocitos, con vistas a su maduración *in vitro*, no está bien determinada. Sin embargo, la mayoría de los autores prefieren ovarios provenientes de animales tiernos, puesto que las posibilidades de encontrar folículos atrésicos y ovocitos degenerados son significativamente menores que en animales de más edad (Gordon, 1990).

2.1.4.2. Selección de folículos

Según Motlik y Fulka. (1986), los folículos menores de 2 mm de diámetro contienen un alto porcentaje de ovocitos incompetentes o bien atrésicos, mientras que los mayores de 10 mm presentan un mayor número de ovocitos degenerados (Fukui y Sakuma, 1980). Por ello, la mayoría de los autores seleccionan folículos de diámetros comprendidos entre 2 y 6 mm (Ratto y col., 2005; Ruiz J., 2009; Huanca y col., 2009).

Por otro lado, Lonnergan y col. (1992) señalan que los folículos, con un diámetro de entre 2 y 6 mm, permiten una tasa de recuperación de ovocitos (N° de ovocitos obtenidos/N° de folículos aspirados) aptos para el cultivo mayor que en los folículos de mayor tamaño. Wurtb y Kruij, (1992) señalan que los ovocitos, procedentes de folículos ligeramente atrésicos, tienen una capacidad normal para madurar *in vitro*, siempre que el cúmulo y el citoplasma no presenten signos claros de degeneración.

2.1.4.3. Obtención de ovocitos

El método más común para recoger ovocitos de ovarios procedentes del camal es la aspiración del contenido folicular, mediante punción de los folículos seleccionados, utilizando para ello agujas estériles de 18 a 21 G, conectadas a jeringas estériles de 10 ml (Del Campo y col., 1992; Ratto y col., 1999; Ratto y col., 2005; Ruiz y col., 2007; Mendoza y col., 2008; Gamarra y col., 2008, Huanca y col., 2009). Otros autores han colectado ovocitos mediante la disección y subsiguiente ruptura de los folículos intactos (Del Campo y col., 1994) aunque según Arlotto y col. (1990) los ovocitos de folículos que no están situados en la superficie ovárica tienen menores posibilidades de madurar *in vitro*.

2.1.5. Selección y clasificación de ovocitos

El estudio de la morfología del ovocito ofrece datos sobre su capacidad de iniciar la meiosis, y dado que no se pueden realizar técnicas invasivas que destruirían la célula, deben establecerse criterios, exclusivamente morfológicos, para seleccionar los gametos que garanticen un buen comportamiento en su maduración (Leibfried y First, 1979; Xu y col., 1986; Younis y col., 1989; De Loos y col., 1992).

La selección se efectúa siguiendo dos criterios:

- I. Aspecto citoplasmático del ovocito: diversos autores han tratado de establecer una relación entre el aspecto del citoplasma y la competencia del ovocito para madurar, ser fecundado y soportar el desarrollo posterior (Younis y col., 1989; Nagao y col., 1995). Así, se ha comprobado que los ovocitos que presentan un ooplama oscuro muestran una acumulación de lípidos y un buen potencial para el desarrollo, mientras que los que presentan un ooplasma pálido tienen una baja densidad de orgánulos y escaso potencial de desarrollo. Por otra parte, cuando el ooplasma es negro, los ovocitos están envejecidos y tienen un potencial para soportar el desarrollo muy bajo (Nagao y col., 1995).
- II. Aspecto y morfología del cúmulo celular: los ovocitos rodeados por un cúmulo compacto formado por varias capas de células, presentan mayores porcentajes de maduración, fecundación y de desarrollo hasta blastocistos, que los que carecen de cúmulo o los que están rodeados solamente por la corona radiata (Xu y col., 1986).

2.1.6. Maduración *in vitro* (MIV)

Durante el proceso de maduración, tanto *in vivo* como *in vitro* de ovocitos, ocurren una serie de cambios que permiten la reanudación de la meiosis. Estos eventos deben ocurrir antes de la fertilización y se caracterizan por la expansión de las células del cúmulus, la eliminación del primer corpúsculo polar y la formación de la metafase II. (Hyttel y col., 1986).

In vitro, la hormona FSH es responsable de la inducción de la maduración de los folículos, y la hormona LH promueve la reanudación de la meiosis de los ovocitos (Moor y col., 1981; Xu y col., 1986).

Las células del cúmulus también desempeñan un papel importante en la maduración de los ovocitos. Estas células aportan nutrientes y energía (piruvato)(Donahue y Stern, 1968), también secretan ácido hialurónico a la

matriz externa de proteoglicanos. Esta secreción provoca la ruptura de la matriz, lo que trae aparejado el fenómeno denominado expansión del cúmulus, dominado por la acción de la FSH y se caracteriza por el cambio de interacción entre las células del cúmulus y el ovocito (Henseleigh y Hunter, 1985).

2.1.6.1. 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 y Waymouth MB752/1). Todos ellos presentan en su composición una mezcla de sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, glucosa, piruvato de sodio, hipoxantina, timidina y rojo fenol como indicador. En dichos medios, los componentes varían en diferentes proporciones. A pesar de la amplia variedad de medios descritos, el más utilizado es el TCM-199 (Wright y Bondioli, 1981; Phillips, 1988; Leibfried-Rutledge y col., 1989; Gliedt y col., 1996a; Gliedt y col., 1996b) por permitir obtener un mayor grado de fertilización, en comparación a los otros medios. (Rose y Bavister, 1992).

2.1.6.2. Suplementación de los medios de cultivo

Según el trabajo de revisión realizado por Brackett y Zuelke (1993) 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*.

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; Eppig y col., 1983; Fukui y Ono, 1989; Sambussho y Threlfall, 1989; Lee y col., 1996).

Otros suplementos utilizados en diferentes concentraciones, son los factores de crecimiento (EGF, IGF-I, IGF-II, TGF, TGF 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 Fukui, 1995; Lee y col., 1996; Bevers y col., 1997).

Como se indicó 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; Xu, y col., 1986; Xu y Greve, 1988; First y Parrish, 1987).

En el estudio realizado por Stubbings y col. (1988) 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.

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 (Brackett y col., 1989; Fukui y Ono, 1989; Harper y Brackett, 1992a; Harper y Brackett, 1992b; Zuelke y Brackett, 1992; Saeki y col., 1994).

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).

Los esteroides más utilizados en los medios de maduración son el estradiol y la progesterona, describiéndose que la adición de ambos completa la maduración nuclear y citoplásmica (Fukui y col., 1982). El estradiol por sí solo parece no afectar a la maduración nuclear del ovocito (Younis y col., 1989), pero sí influye en la maduración citoplásmica y sobre todo en la fecundación. Por otro lado, la presencia de este esteroide, en el medio de maduración, se considera un factor importante para la formación del pronúcleo masculino (Fukui y col., 1982; Thibault, 1987), aunque hay autores que indican que una suplementación exclusiva con estradiol, durante la maduración, puede provocar anomalías cromosómicas (Kruip y col., 1983).

2.1.6.3. Condiciones medioambientales

A efectos de optimizar la maduración *in vitro*, es importante proveer al ovocito un 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; Yang y col., 1998).

La temperatura más adecuada para el cultivo *in vitro* de los ovocitos es de 38.5°C (Lenz y col., 1983; Leibfried-Rutledge y col., 1989; Rose y Bavister, 1992; Pinyopummintr y Bavister, 1995; Azambuja y col., 1998).

Lenz y col. (1983), informan que las temperaturas comprendidas entre 37°C y 41°C no perjudican el proceso de maduración *in vitro* de los ovocitos. Del mismo modo, en un estudio realizado por Shi y col. (1998) donde la temperatura de cultivo *in vitro* de ovocitos es modificada entre valores de 37°C y 38.5°C, observaron 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, 1994).

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; Brackett B., 1981; Phillips, 1988). El control del pH en el medio de maduración se realiza gracias a la concentración de CO₂ 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 y 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 CO₂ en el aire, o bien, 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂ (Fukui y col., 1982; Lu y col., 1987; Younis y cols., 1989; Takahashi y col., 1996).

2.1.6.4. Sistemas de cultivo

Sobre la maduración se han dado lugar diversas metodologías y modificaciones de las técnicas de cultivo de los ovocitos. Fundamentalmente, se tienen en cuenta: el soporte físico sobre el que se va a realizar la maduración (placa, tubo, etc), el modo de colocación del medio de cultivo, el número de ovocitos por volumen de medio y si el cultivo se realiza de manera estática o con un ligero movimiento.

Sugie y col. (1980) señalan dos grupos de sistemas de cultivo: un cultivo en el que no se permite el intercambio gaseoso con la atmósfera (mediante el uso de un cierre hermético) y un segundo tipo de cultivo que se realiza manteniendo un intercambio gaseoso continuo. El primero no tiene interés ya que no permite el intercambio gaseoso necesario para la maduración de los ovocitos, mientras que dentro del segundo grupo se pueden citar dos tipos: los sistemas abierto y cerrado.

2.1.6.4.1. Sistema abierto

El sistema abierto engloba aquellos recipientes en los que se coloca un volumen de medio de cultivo que está en contacto directo con la atmósfera que le rodea. El medio se coloca en placas Petri (Fukui, 1990), cámaras de cultivo (Leibfried y First, 1980; Xu y Greve., 1988), placas ELISA (Farin y Yang, 1992) o tubos de cristal (Fukui y Sakuma, 1980). El inconveniente de este sistema es que presenta una gran superficie de evaporación, lo cual puede originar un aumento de la osmolaridad, al elevarse la concentración de sodio.

2.1.6.4.2. Sistema Cerrado

El sistema cerrado consiste en recubrir el medio de cultivo con aceites minerales, de tal manera que se impida la evaporación del medio pero se permite el intercambio gaseoso con la atmósfera. El modo más corriente de efectuar este tipo de cultivo es el de las "microgotas" (Brinster, 1970), el cual consiste en colocar un determinado número de gotas (generalmente siete), con un volumen de 45 a 50 μ l, en una placa de Petri y recubrirlas, posteriormente, con aceite de parafina o silicona. El agua no se evapora fácilmente, pero alguno de los componentes del medio puede ser soluble en aceite; por ello, hay que equilibrarlo antes de iniciar el periodo de cultivo (Whitten, 1971). El sistema de microgotas permite una identificación individual de los ovocitos, minimiza los riesgos de contaminación y facilita el cultivo independiente de los ovocitos y una observación de los mismos más fácil que con otros sistemas.

En cuanto al número de ovocitos que pueden colocarse en el medio, los autores que utilizan el sistema abierto ponen un número de 20-30 ovocitos/ml de medio (Fukui, 1990; De Loos y col., 1992), mientras que con el sistema de microgotas se colocan de 5 a 10 ovocitos por microgota (Ratto y col., 1999; Ratto y col., 2005; Ruiz y col., 2007; Mendoza y col., 2008; Gamarra y col., 2008, Huanca y col., 2009).

2.1.6.5. Criterios de maduración *in vitro*

El ovocito inmaduro presenta una morfología, definida y característica, que sufrirá importantes cambios a lo largo del proceso de maduración. Dichos cambios morfológicos se demuestran utilizando técnicas de tinción por microscopía óptica o electrónica (Xu y col., 1986; Hyttel y col., 1986; De Loos y col., 1992).

2.1.6.5.1. Morfología del ovocito inmaduro

El ovocito, aislado de su folículo, presenta un núcleo grande, situado periféricamente, rodeado de la membrana nuclear y con un nucleolo apenas visible (Hyttel y col., 1986; De Loos y col., 1992). Este estado nuclear corresponde con el estadio de Vesícula Germinal (GV).

Los orgánulos citoplásmicos se distribuyen por todo el citoplasma de la célula y así las mitocondrias se localizan en la periferia, mientras que en posición central se encuentran gránulos corticales, Retículo Endoplásmico rugoso (REr), aparato de Golgi y vesículas lisosomales (Kruip y col., 1983).

El espacio perivitelino no existe o es muy pequeño y la zona pelúcida se encuentra atravesada por las prolongaciones de las células de la corona radiada, constituyéndose como uniones intercelulares ("gap junctions"). Estas uniones llegan incluso hasta el interior del ovocito y sirven como "puente" de unión entre éste y las células del cúmulo que le rodean y también entre ellas mismas. Estas vías de comunicación celular pueden ocupar hasta el 1% de la superficie total de

la membrana plasmática del ovocito (Moor y Gandolfi, 1987). El ovocito inmaduro presenta el cúmulo celular compacto e incluso dificulta la visión del propio ovocito (Leibfried y First, 1979).

2.1.6.5.2. Morfología del ovocito durante la maduración

El inicio de la maduración está marcado por cambios nucleares y citoplásmicos que ocurren en periodos de tiempo distintos según la especie. En ovocitos bovinos, entre las 3 y 6 h de iniciado la maduración, comienzan los cambios en el núcleo del ovocito que culminan con la desaparición de la membrana nuclear (GVBD). De 12 a 16 h, se llega al estadio de metafase I (Xu y col., 1986) y de las 19 a las 24 h se produce la formación del primer corpúsculo polar al espacio perivitelino, llegando rápidamente al estadio de metafase II, donde se detiene nuclearmente la meiosis en espera de que ocurra la fecundación (Xu y col., 1986; Hyttel y col., 1986; Hyttel, 1988; Sirard, 1989).

Los cambios citoplásmicos a lo largo de este período se resumen en una elevada actividad de síntesis proteica y una reordenación de los sistemas de microtúbulos, debido a la intensa actividad cromosómica (Hyttel y col., 1986).

Además, también existe un agrupamiento de las mitocondrias y los gránulos corticales que comienzan a situarse periféricamente (Ducibella y col., 1988). En cuanto respecta a las uniones intercelulares, comienzan a retraerse a las 3 h de iniciada la maduración (Hyttel y col., 1988) y a las 18 h sólo quedan restos de las mismas en el espacio perivitelino, que a la vez que progresa la maduración, se hace cada vez mayor (Xu y col., 1986).

Entre las 10 y 12 h del comienzo de la maduración, el cúmulo que rodea al ovocito inicia su expansión, que llega a ser máxima a las 18 h del inicio del cultivo (Hyttel y col., 1986). La expansión se debe a la mucificación entre las células, por la presencia de ácido hialurónico en la matriz intercelular y, también,

a la posible presencia de un factor desconocido que favorece la expansión y que se transfiere desde el mismo ovocito hasta el cúmulo (Buccione y col., 1990).

2.1.6.5.3. Morfología del ovocito maduro

Se caracteriza por la expansión total del cúmulo celular y por la presencia del primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino (Leibfried y First, 1979; Xu y col., 1986). A nivel nuclear, los cromosomas presentan la configuración de metafase II.

Los cambios citoplásmicos no se completan hasta las 30 h de haber comenzado la maduración, aunque nuclearmente la maduración finaliza a las 24 h (Hyttel, 1988). Estos cambios citoplásmicos incluyen, sobre todo, dos procesos: la colocación de los gránulos corticales a la periferia, situándose bajo la membrana plasmática (Ducibella y col., 1988), y el agrupamiento de mitocondrias y RER en cisternas de gran tamaño (De Loos y col., 1992). En esta fase final de la maduración, sigue existiendo una alta actividad de síntesis proteica con el fin de preparar al ovocito, nuclear y citoplásmicamente, para la fecundación (Moor y Gandolfi, 1987; De Loos y col., 1992).

Estos fenómenos cronológicos, descritos en la maduración corresponden tanto a los ovocitos madurados *in vivo* como *in vitro* (Kruip y col., 1983; Hyttel, 1988). Las diferencias más notables entre ambos tipos de maduración, estriban fundamentalmente en que los ovocitos madurados *in vitro* sufren por un lado, un retraso en la migración de los gránulos corticales a la periferia del ovocito (Cran, 1989; Hyttel y col., 1986) y por otro, presentan un mayor número de prolongaciones celulares, provenientes de las células de la corona radiada, en el espacio perivitelino (De Loos y col., 1992).

Por lo tanto, los criterios que aseguran que ha ocurrido la maduración *in vitro* pueden resumirse en:

- 1° Formación del primer corpúsculo polar y llegada al estadio de metafase II.

2° Expansión y mucificación del cúmulo celular.

3° Traslado de los gránulos corticales a la periferia del ovocito (Ducibella, 1988; Cran, 1989; Buccione y col., 1990).

4° Desaparición de las uniones intercelulares (De Loos y col., 1992).

2.1.7. Fecundación *in vitro* (FIV)

Finalizado el periodo de maduración *in vitro*, los ovocitos se encuentran aptos para ser fertilizados. Tanto para condición *in vivo* como *in vitro*, previo a la fertilización de los ovocitos, los espermatozoides deben estar capacitados y activados. La capacitación y activación del espermatozoide, posibilitará a este progresar a través de las células del cúmulus y penetrar la zona pelúcida.

Existen pocos reportes de fecundación *in vitro* (FIV) en camélidos sudamericanos : Del Campo y col. (1994); Del Campo y col. (1995); Gómez y col. (2002); Conde y col. (2006); Ratto y col. (2007); Conde y col. (2008); Gamarra y col. (2008); Mendoza y col. (2008); Machicado y col. (2009) y Berland y col. (2010).

Del Campo y col. (1994) separando epidídimos de testículos de llama macho y utilizando la técnica de centrifugación en gradiente de Percoll, fecundó ovocitos madurados *in vitro* de llama logrando obtener por primera vez el desarrollo de embriones de camélidos sudamericanos producidos por FIV.

Conde y col. (2006) utilizaron un sistema similar para FIV en llamas, recuperó gametos de animales vivos, los ovocitos fueron recuperados por punción folicular de ovarios expuestos por laparotomía lateral en hembras superovuladas y los espermatozoides fueron recuperados por electroeyaculación.

Gómez y col. (2002) fecundaron ovocitos de alpaca con semen epididimario de llamas beneficiadas. Los ovocitos de alpaca fueron recuperados por punción de los folículos ováricos expuestos por laparotomía ventral en hembras

superovuladas. Este sería el primer reporte de la producción de embriones híbridos de alpaca-llama después de una fecundación *in vitro* heteróloga, experiencia que también fue reportada por Ratto y col. (2007). Sin embargo, Del Campo y col. (1995) indican que recuperaron ovocitos de alpacas superovuladas los cuales fueron fecundados con semen de llama y los embriones producidos desarrollaron hasta el estadio de blastocisto expandido.

En Perú, también existen reportes sobre fecundación *in vitro* en alpacas (Gamarra y col., 2008; Mendoza y col., 2008). Gamarra y col. (2008) congelaron espermatozoides epididimarios previamente diluidos en una solución de TRIS-Fructosa con 10% de glicerol. Los pellets 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 10×10^6 espermatozoides/gota de 100ml de Fert-TALP.

Por otro lado, Mendoza y col. (2008) compararon los métodos de gradiente de Percoll y Swim up para la recuperación de espermatozoides epididimarios para utilizarlos en la fecundación *in vitro* de ovocitos de alpaca 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 min con una inclinación de 45°. Los ovocitos previamente colocados en Fert-TALP fueron inseminados con una concentración final aproximada de $2.5 - 3.5 \times 10^6$ espermatozoides/ml.

En Bolivia, Machicado y col. (2009) recuperaron COCs por laparotomía en llamas superovuladas con eCG, los COCs fueron madurados *in vitro* en TCM-199 con BSA. Posteriormente, los ovocitos fueron inseminados con semen fresco tratado con proteasa.

En Chile, Berland y col., (2010), recuperaron COCs en llamas superovuladas con eCG y FSH. Los COCs expandidos colectados con ambos tratamientos fueron fecundados *in vitro* usando espermatozoides epididimarios. Los gametos fueron co-incubados a 38.5°C con 5% CO₂ por 18 h. Después de la fecundación *in vitro*, los presuntos cigotos fueron incubados en medio SOF suplementado con 0.6% de BSA con células de la granulosa de llama a 39°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ por 7 días.

2.1.7.1. Lavado y selección de espermatozoides

Al menos dos metodologías han sido descritas para el lavado de las células espermáticas y su selección en Camélidos Sudamericanos. Estas son: Swim-up y gradiente de percoll (Del Campo y col., 1994; Del Campo y col., 1995; Gómez y col., 2002; Conde y col., 2006; Ratto y col., 2007; Conde y col., 2008; Gamarra y col., 2008; Mendoza y col., 2008; Machicado y col., 2009; Berland y col., 2010). El método de swim-up separa los espermatozoides móviles de los no móviles. De este modo, una muestra de semen colocada en el fondo de un tubo que contiene medio de cultivo a 37° C, permitirá después de un tiempo de cultivo, que los espermatozoides móviles se desplacen hacia la superficie del tubo (Parrish y col., 1986).

El percoll está constituido por partículas coloidales de 15 a 30 nm de diámetro cubiertas con polivinilpirrolidona (PVP). El sistema de separación de espermatozoides consiste en la colocación, en un tubo estéril, de 2 gradientes de percoll (55% y 90%) diluido en medio de cultivo Sperm-TALP. El semen se siembra en la parte superior del tubo y se centrifuga a 200 g durante 25 min. a temperatura ambiente. Algunas partidas de percoll utilizado, tienen efectos deletéreos sobre los espermatozoides. Este efecto es debido principalmente al PVP que rodea a las partículas coloidales.

Un estudio realizado por Mendoza y col. (2008) comparó estas dos técnicas, gradiente de Percoll y Swim-up, para utilizarlos en la fecundación *in vitro* de

ovocitos de alpaca. Los resultados mostraron que, si bien los medios utilizados en las dos técnicas difieren entre sí, la separación por Swim-up fue más efectiva que la de gradiente de percoll.

2.1.7.2. Cocultivo de ovocitos con espermatozoides

Una vez que los espermatozoides han sido lavados, seleccionados y capacitados, se realiza el cocultivo de estos con los ovocitos madurados *in vitro*.

2.1.7.2.1. Medios empleados y tiempo de cocultivo

De acuerdo a la revisión bibliográfica, la mayoría de las experiencias llevadas a cabo en fertilización *in vitro* en Camélidos Sudamericanos, utilizan básicamente el medios TALP para el lavado y capacitación del semen. A su vez, el cocultivo *in vitro* del semen con los ovocitos se realiza en un periodo de tiempo de 18 a 24 h.

En el tiempo de cocultivo, se emplean tres medios TALP diferentes según el momento en el que se utilicen.

- El medio Sperm-TALP se utiliza para el lavado del semen.
- El medio TALP- HEPES se utiliza para la manipulación de los ovocitos.
- El medio Fert-TALP se utiliza para el cocultivo de los ovocitos con los espermatozoides.

La diferencia entre estos tres medios, radica en el contenido de NaCl, NaHCO₃, Na₂HPO₄ y lactato de sodio. Asimismo, el medio Sperm-TALP se suplementa con heparina, para permitir la capacitación de las células espermáticas, mediante el desplazamiento de las proteínas decapacitantes de la membrana plasmática y la estimulación de la apertura de los canales de calcio.

2.1.7.3. Relación ovocito/espermatozoide en el cocultivo

La relación ovocitos/espermatozoides es importante durante la fertilización *in vitro*. De este modo, ha podido establecerse que si el número de células espermáticas es demasiado bajo en relación con el número de ovocitos, obtendremos resultados de fertilización pobres. Si por el contrario, el número de células espermáticas es demasiado alto se producen fenómenos de polispermia (First y Parrish, 1987; Saeki y col., 1995).

Independientemente del medio de fertilización utilizado, la mayor parte de los protocolos de fertilización *in vitro*, utilizan entre 0.5 y 3.5×10^6 células espermáticas/ml y el cocultivo con los ovocitos madurados *in vitro*, se lleva a cabo en microgotas de 50 μ l, que contienen entre 5 y 10 ovocitos (Del Campo y col., 1994; Del Campo y col., 1995; Gómez y col., 2002; Conde y col., 2006; Ratto y col., 2007; Conde y col., 2008; Gamarra y col., 2008; Mendoza y col., 2008; Machicado y col., 2009; Berland y col., 2010).

Cox y col. (1993) y Zhang y col. (1995) informan que la presencia de las células del cúmulus en los ovocitos cocultivados con los espermatozoides, incrementan los porcentajes de fertilización. Estos incrementos son debidos a que el cúmulus induce los mecanismos de capacitación espermática, facilitando la interacción del espermatozoide y la superficie de la zona pelúcida.

2.1.8. Sistemas de cultivo *in vitro* de embriones

En la actualidad existen tres sistemas para el cultivo de los cigotos y su posterior desarrollo *in vitro* hasta el estadio de blastocisto: el sistema de cocultivo, el cultivo en medios definidos y el cultivo en medios condicionados (Fukui y col., 1991; Nagao y col., 1995; Hernandez-Ledezma y col., 1996; Marquant-Leguienne y Humbolt, 1998).

- Sistema de cocultivo: Este sistema, utiliza diferentes tipos celulares para cocultivar con los cigotos. Estos tipos celulares aportan a los cigotos, los elementos necesarios para el desarrollo *in vitro* y la superación del estado de bloqueo 8-16 células (Eyestone y First, 1989; Weimer y col., 1991; Katska y col., 1995; Nagao y col., 1995; Abe y Hoshi, 1997). Los tipos celulares utilizados son: células del epitelio oviductal (BOEC), células del cúmulus, células de la granulosa, monocapa de células uterinas o bien, líneas celulares definidas tales como BRL (buffalo cell liver rat) y Vero.
- Sistema de cultivo con medios definidos: Este sistema incluye a los medios SOF, SOFM; CR1a, CZB, mTLP-PVA y KSOM (Kim y col., 1993; Carolan y col., 1995; Keskintepe y col., 1995; Lee y Fukui, 1995; Keskintepe y Brackett, 1996; Palasz, 1996; Takahashi, y col., 1996). Estos medios eliminan la variabilidad de los resultados, la utilización extra de subproductos de origen animal y tienden a simplificar los sistemas de cultivo (Carolan y col., 1995; Marquant-Leguienne y Humbolt, 1998).

2.2. ANTECEDENTES

Muy pocos estudios han sido conducidos sobre la maduración *in vitro* de ovocitos (Del Campo y col., 1992; Del Campo y col., 1994; Sansinema y col., 2003; Sansinema y col., 2007; Miragaya y col., 2002; Chaves y col., 2003; Ratto y col., 1999; Ratto y col., 2005; Ratto y col., 2007; Ruiz y Correa, 2007) en camélidos sudamericanos.

Complejos Ovocito Cúmulo (COCs) de llama fueron madurados *in vitro* (MIV) por primera vez por Del Campo y col. (1992), utilizando un tiempo de 36 h de maduración en medio TCM-199 suplementado con suero fetal bovino, piruvato de sodio, Hormona Foliculo Estimulante (FSH), estradiol y sulfato de gentamicina, obteniendo 62% de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II. En otro experimento, Del Campo y col. (1994) obtuvieron 30% de ovocitos en metafase II luego de 30 h de MIV. Distintos protocolos de recuperación de COCs

se utilizaron en ambos experimentos lo que podría explicar los diferentes resultados.

Así mismo, Ratto y col. (1999) utilizando un protocolo similar de MIV mejoraron sustantivamente los resultados anteriores. En este trabajo evaluaron 26, 30 y 36 h de maduración *in vitro* de COCs de llamas, teniendo como resultados 58%, 73% y 75% de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II sin notarse diferencias estadísticas significativas entre los tres tiempos. Por otro lado, Miragaya y col. (2002) utilizando un tiempo de 30 h con un medio diferente a los casos anteriores (TCM 199 con bicarbonato, 10% de suero fetal bovino y glutamina), obtuvieron 62% y 74% de ovocitos en metafase II para COCs recuperados de llamas sin superovulación y con superovulación, respectivamente.

En otro estudio, Ratto y col. (2005), utilizando un medio de maduración consistente en TCM-199 suplementado con piruvato de Na 0.2mM, sulfato de gentamicina 25 µg/ml, FSH 0,5 µg/ml, estradiol 17-β 1 µg/ml y suero fetal bovino al 10%, encontraron 77.7%, 80.6% y 80.4% de ovocitos maduros cuando utilizaron 28, 30 y 36 h para la maduración *in vitro* de COCs de llama sin notar diferencias estadísticas entre los tres tiempos. Por otro lado, Sansinema y col. (2003) utilizando 30 h para la MIV de COCs de llama y adicionando la hormona LH en la preparación del medio (TCM-199, 5 µg/ml de FSH, 10 µg/ml de LH, 1 mg/ml de estradiol 17-β y 10% de suero fetal bovino), obtuvieron 52% de ovocitos maduros. Posteriormente el mismo grupo de investigación (Sansinema y col. 2007) utilizando un medio diferente para la MIV de ovocitos de llama consistente de TCM-199, 5 µg/ml de FSH, 10 µg/ml de LH, 10 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de IGF-1 y 1 µg/ml de estradiol 17-β y 10% de suero fetal bovino, mejoraron su anterior resultado con 74% de ovocitos en metafase II luego de 30 h de MIV.

También se han madurado con éxito ovocitos de vicuña y alpaca. Chaves y col. (2003), reportaron la primera maduración *in vitro* de ovocitos de vicuña utilizando un tiempo de 27 h para la maduración en un medio similar al utilizado por Miragaya y col. (2002) consistente de TCM-199 con bicarbonato, 10% de suero fetal bovino y glutamina; obteniendo 41% de maduración nuclear con extrusión del primer cuerpo polar.

En alpacas, Gómez y col. (2002) y Ratto y col. (2007) han utilizado 26 h para la maduración *in vitro* de ovocitos recuperados por laparatomía ventral. Gómez obtuvo 46% y 40% de ovocitos en metafase II en alpacas donantes superovuladas con FSH y eCG respectivamente.

Por otro lado, Ruiz y Correa (2007) maduraron ovocitos de alpaca y llama durante 27 y 30 h respectivamente en un medio compuesto por TCM-199 suplementado con piruvato de Na 0.2 mM, sulfato de gentamicina 50 µg/ml, FSH 0,02 unidades/ml, estradiol 17-β 1 µg/ml y suero fetal bovino al 10%. Obtuvieron tasas de 75% y 100% de ovocitos maduros de llama y alpaca respectivamente.

En otro estudio Huanca y col. (2009), utilizando un medio de maduración compuesto por TCM-199 suplementado con 10% FCS (v.v), 0.5 µg mL⁻¹ FSH, 10 µg mL⁻¹ hCG, 0.2 mM piruvato de sodio, 50 µg mL⁻¹ gentamicina y 1 µg mL⁻¹ Estradiol, encontraron 18.9%, 42.9% y 65.8% de ovocitos maduros de alpaca que llegaron a Metafase II cuando utilizaron 30, 34 y 38 h de la cultivo respectivamente.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización de la zona de investigación y muestreo

El trabajo de investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica - Ciudad Universitaria, Paturpampa.

Las muestras de ovarios y testículos de alpaca se colectaron en el Camal Municipal de Huancavelica situado a 5 Km de la ciudad, a una altitud de 3680 msnm, con una temperatura ambiental promedio de 11.5°C.

3.2. Población y muestra

La población estuvo conformada por el total de alpacas sacrificadas en el Camal Municipal de Huancavelica. La muestra se tomó a 352 alpacas de manera no probabilística por las características de las mismas, para cuyo efecto, se consideró los criterios: oportunidad y cantidad de beneficios.

Como unidad de muestra se tomó 750 ovarios de alpaca.

3.3. Maduración *in vitro*

3.3.1. Obtención de ovarios

Los ovarios se obtuvieron de alpacas sacrificadas en el Camal Municipal de Huancavelica y fueron recogidos rápidamente tras el desuello de los animales. Se transportaron al laboratorio en un termo a temperatura ambiente (15-18°C) y siempre dentro de las dos horas siguientes a la obtención de los mismos. Una vez en el laboratorio se lavaron cuatro veces con solución salina fisiológica (SSF) al 0.9% atemperada a 37°C, para eliminar la sangre y adherencias. Los ovarios se depositaron en un vaso de precipitado de 50 ml con SSF y se dejó atemperar a 37°C por 10 minutos.

3.3.2. Recuperación de ovocitos

Se obtuvo Complejos Ovocito-Cúmulo (COCs) de acuerdo al protocolo descrito por Ratto y col. (2005) con algunas modificaciones.

Se procedió al aspirado de los folículos (2 a 6 mm) mediante agujas 21 G en jeringas de 10 ml las cuales contenían medio de maduración (IVM) en una cantidad de 2 ml, todo esto se procedió sobre una platina térmica atemperada a 37.5°C. Luego de la aspiración, el líquido folicular contenido en la jeringa fue transportado a la estufa eléctrica por espacio de 5 minutos a 37.5°C para posteriormente ser depositado sobre placas de Petri (atemperadas y demarcadas en cuadrículas) e iniciar la selección.

Se clasificó y seleccionó los COCs utilizando la tabla descrita por Ratto y col. (2005), categorizándolos del I al IV según la compactación del cúmulo y el aspecto citoplasmático, para lo cual se utilizó una micropipeta de 10 µl y una lupa estereoscópica con un aumento de 20 X, se procedió a hacer la selección en la placa de Petri, manteniendo constante la temperatura.

Así se seleccionó sólo los ovocitos de categoría I y II, descartando inmediatamente aquellos de pequeño tamaño, con cúmulus muy oscuros y aquellos que tenían un citoplasma irregular con áreas muy claras o muy oscuras.

3.3.3. Maduración de ovocitos seleccionados

La maduración de los ovocitos se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Ratto y col. (2005) con algunas modificaciones introducidas por Ruiz y col. (2011).

El cultivo *in vitro* de los ovocitos seleccionados como aptos para la maduración, se realizó en microgotas de 50 µl de medio de maduración Tissue Culture Medium – 199 (TCM-199) suplementado con HEPES 25mM, Piruvato de sodio 0.2 mM, Sulfato de gentamicina 50 µg/ml, FSH 0.02 unidades/mi, Estradiol 17-β 1 µg/ml y Suero Fetal Bovino (FCS del ingles Fetal Calf Serum) al 10% (v/v).

Las microgotas se prepararon en placas de cultivo estériles desechables, de 35x10 mm y se cubrieron con aceite mineral. Seguidamente, las placas se colocaron en una cámara de cultivo a 38.5°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad, durante 2 h (tiempo de equilibrio) antes de colocar los ovocitos seleccionados. Posteriormente, se colocaron entre 10 a 15 ovocitos en cada microgota.

La maduración de los ovocitos se realizó en cámara de cultivo a 38.5°C, 5% CO₂ y 90% de humedad, durante 24, 28 y 32 h.

3.3.4. Evaluación del estadio nuclear de los ovocitos

Para visualizar las estructuras cromosómicas se utilizó una metodología de fijación y tinción basada en la técnica descrita por Chang (1951), con algunas modificaciones.

En primer lugar, se procedió a limpiar y desengrasar los portaobjetos y cubreobjetos utilizando una mezcla de etanol (96%) y éter etílico (1:1); luego,

sobre los cubreobjetos, se colocó una cantidad mínima de vaselina comercial a la misma distancia de las cuatro esquinas del cubreobjetos.

Transcurrido el tiempo de maduración, los ovocitos seleccionados para la fijación y tinción se extrajeron del medio de cultivo y se introdujeron en una solución de hialuronidasa 1 mg/ml por 1 minuto, pasado este tiempo se aspiraron repetidamente con una micropipeta de 20 μ l con el objeto de remover completamente las células del cúmulo adheridas a la zona pelúcida, para luego ser lavados en PBS al 1%.

Sobre el portaobjetos se depositó una pequeña gota de PBS en la que fueron incluidos 5 ovocitos, y sobre ellos se colocó el cubreobjetos, se presionó ligeramente hasta contactar con la gota, evitando que los ovocitos se revienten.

El siguiente paso fue la introducción del portaobjetos en una cubeta de plástico que contenía el fijador Carnoy a 4°C (metanol absoluto:ácido acético glacial, 3:1) durante 24 h para su fijación. Después de este periodo de tiempo, los portaobjetos se extrajeron de la solución de fijación y se secaron con papel absorbente. Luego de esto, se cogió el colorante (orceína acética al 1%) con una micropipeta de 100 μ l, y se dejó caer la gota sobre uno de los extremos del portaobjetos; de esta manera, el colorante pasó poco a poco por capilaridad, a través de todo el espacio entre portaobjetos y cubreobjetos hasta llegar al extremo opuesto, el exceso de colorante se eliminó y se dejó reposar por 8 minutos, pasado este tiempo se procedió a decolorar las muestras utilizando una solución de glicerol:ácido acético:agua destilada (1:1:3).

La morfología nuclear de los ovocitos teñidos se examinó bajo un microscopio óptico, con objetivo de 40X, para luego ser clasificados en 4 categorías en función a su estadio nuclear: Vesícula Germinal (VG), Vesícula Germinal Rota (GVBD), Metafase I (M-I) y Metafase II (Mii).

3.4. Fecundación *in vitro*

3.4.1. Recuperación y selección de espermatozoides

Se colectaron testículos de alpacas sacrificadas (superiores a 3 cm de diámetro), los que fueron trasladados al laboratorio en termos a una temperatura ambiente (15-18°C), dentro de las dos horas siguientes a la obtención de los mismos.

La recuperación de espermatozoides se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Ratto y col. (2005) con algunas modificaciones, se separó los conductos deferentes y el epidídimo del testículo, previo lavado de estos con SSF 0.9% atemperados a 37°C, para posteriormente depositarlos en una placa de Petri y adicionarles 2 ml de medio Sperm-TALP suplementado con 2 mg/ml de BSA, piruvato de sodio al 1 mM y sulfato de gentamicina 50 µg/ml, se procedió a realizar cortes transversales del epidídimo y hacer el ordeñado de estos.

Los espermatozoides recuperados se lavaron y seleccionaron mediante la técnica de swim-up: se colectó y depositó 1 ml del ordeñado del epidídimo en un eppendorf y se llevó a la centrifuga a 1500 rpm por 5 minutos, obteniendo un pellet en el fondo del eppendorf. Se retiró el sobrenadante dejando una mínima cantidad, para posteriormente vortexear y disolver el pellet. El homogenizado se colectó con una micropipeta de 100 µl y se depositó en el fondo de un eppendorf que contenía 1 ml de medio Fert-TALP, luego se llevó a la incubadora a 37°C durante 30 minutos a 90% de humedad y 5% de CO₂, con una inclinación de 45°. Pasado los 30 minutos, se colectó el sobrenadante y se depositó en otro eppendorf para ser centrifugado a 1500 rpm por 3 minutos, se retiró el sobrenadante dejando una mínima cantidad y se homogenizó, se llevó a la incubadora por unos minutos hasta su utilización.

3.4.2. Preparación de los ovocitos

Después del tiempo de maduración *in vitro* (24, 28 y 32 h), se soltó ligeramente las células del cúmulo mediante agitación mecánica con una micropipeta de 25 μ l. Los ovocitos se lavaron en cuatro gotas de medio Fert-TALP, para luego ser depositadas en gotas de fecundación hasta el momento de la inseminación.

El medio de fecundación se dispuso en microgotas de 50 μ l de Medio Fert-TALP, en placas de Petri estériles de 35x10 mm. Las microgotas se cubrieron totalmente con aceite mineral y se equilibraron en la incubadora de CO₂ a 38.5 °C por espacio de 2 h antes de iniciar la fecundación *in vitro*. En cada microgota se colocaron 5 ovocitos.

3.4.3. Fertilización de ovocitos

La fecundación *in vitro* se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Ratto y col. (2005). A cada gota de fecundación se añadió 5 μ l de suspensión de espermatozoides capacitados, con una concentración final aproximada de 1.5-2x10⁶ espermatozoides/ml. Ovocitos y espermatozoides se mantuvieron juntos, en la incubadora durante 18 h a 38.5°C, 90% de humedad y 5% de CO₂.

3.5. Cultivo *in vitro* de embriones

El cultivo *in vitro* de embriones se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Martínez-Díaz y col. (2007). Luego de la inseminación, los ovocitos se cultivaron por 7 días en gotas de 50 μ l de Medio Fluido Oviductal Sintético (SOF-IVC) suplementado con 3 mg/ml de BSA en una incubadora a 38.5°C, 90% de humedad y 5% de CO₂.

3.6. Evaluación de los resultados

3.6.1. Clasificación de ovocitos

Luego de la aspiración folicular, los Complejos Ovocito-Cúmulo (COCs) se clasificaron de acuerdo a la compactación del cúmulo y su aspecto citoplasmático, según los criterios de Ratto y col. (2005).

Tabla 01. Clasificación del Complejo Cúmulo Ovocito (CCOs) de Alpaca

Categorías	Características por Categoría
1	COCs con cúmulos de capas múltiples (>5 capas), compacto, claro y transparente; citoplasma con granulación fina y homogéneo.
2	COCs parcialmente rodeados por células del cúmulo (entre 2-4 capas) más oscuros y menos transparentes; citoplasma de granulación más gruesa y más oscura que en la categoría 1.
3	COCs con cúmulo \leq 1 capa de granulosa o en partes desnudo.
4	Incluye a los ovocitos con cúmulo expandido, parcialmente desnudos o totalmente desnudos; citoplasma granular.

Fuente. Ratto y col. (2005).

3.6.2. Evaluación del estadio nuclear de los ovocitos

Luego de la fijación y tinción de los ovocitos se evaluó las siguientes configuraciones meióticas, según los criterios de Villamediana (1998).

❖ **Ovocitos inmaduros:**

- **Vesícula germinal (VG):** El núcleo del ovocito está intacto. La membrana nuclear es visible y la cromatina está solamente dispuesta alrededor del

nucleolo, que habitualmente también está presente. En el resto del núcleo hay pocas zonas que se tiñen con orceína aunque, a veces, la cromatina se distribuye en grumos que sí se tiñen.

- **Vesícula Germinal Rota (GVBD, "Germinal Vesicle Breakdown")**
Desaparecen la membrana nuclear y el nucleolo, lo que constituye la degradación y desaparición de la vesícula germinal (GVBD). A veces, se observa la membrana nuclear de forma difusa, y los cromosomas bivalentes comienzan a contraerse e individualizarse.
- **Metafase I (M-I):** Los cromosomas se encuentran condensados e individualizados al máximo, generalmente agrupados en masa y aglutinados en la zona ecuatorial del ovocito.
- **Anafase I (A-I):** Ocurre cuando los cromosomas, que se encuentran bajo división o segregación, se disponen a lo largo del huso acromático.

❖ **Ovocitos maduros:**

- **Telofase I (T-I):** La posición de los cromosomas es terminal, en ambos polos del huso acromático. A veces se puede observar la membrana del primer corpúsculo polar, aunque el huso acromático esté todavía presente.
- **Metafase II (M-II):** En este estadio los cromosomas están contraídos y situados en el ecuador del segundo huso acromático. Además, también se visualizan los cromosomas correspondientes al primer corpúsculo polar.

❖ **Ovocitos con el material nuclear degenerado**

- **Degenerados (DEG):** Todas aquellas estructuras nucleares (que se tiñen con la orceína) que se encuentran dispersas e incompletas, o grandes zonas vacuolizadas y fragmentadas en el citoplasma del ovocito.

3.6.3. Evaluación del desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario se evaluó de acuerdo a la tasa de división celular, así se dividió en:

- ✓ **Segmentado (día 2-4):** De 2 a 16 células.
- ✓ **Mórula temprana (día 5):** El cigoto presenta aproximadamente entre 16 y 32 células, su forma es similar a la de una mora en la cual es posible distinguir individualmente a los blastómeros. Su masa celular ocupa casi todo el espacio perivitelino.
- ✓ **Mórula compacta (día 5-6):** Aproximadamente entre 32 y 64 blastómeros. Éstos están unidos y constituyen una masa compacta que ocupa sólo el 60 a 70% del espacio perivitelino.
- ✓ **Blastocisto temprano (día 7):** Aproximadamente entre 100 y 200 células. Se caracteriza por el comienzo del transporte de fluido en las células trofoectodérmicas y por la formación de una cavidad (blastocelo) en el interior del embrión, dando la apariencia de un anillo de sello. El blastocisto temprano ocupa 70-80% del espacio perivitelino. Es posible diferenciar el trofoblasto de la masa celular interna.
- ✓ **Blastocisto expandido (día 7-8):** Más de 200 células. El diámetro aumenta considerablemente, con el consecuente adelgazamiento de la zona pelúcida a un tercio de su espesor original. Los embriones que llegan a este estadio generalmente se degeneran por deshidratación.
- ✓ **Blastocisto protruido (día 8-9):** Aproximadamente entre 200 y 800 células. Los embriones han abandonado la zona pelúcida. Su forma puede ser esférica, con un blastocelo bien definido o colapsado.

3.7. Diseño estadístico

Las diferencias estadísticas de los experimentos (maduración nuclear de ovocitos y desarrollo embrionario) fueron comparadas utilizando análisis de varianza (ANOVA, $\alpha=0.05$) después de la transformación arcsen de los datos. Se utilizó la prueba de Duncan para contrastar la diferencia entre promedios.

El modelo estadístico a utilizar para describir una observación fue:

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

Los componentes del modelo son:

- Y_{ij} = observaciones (% VG, GVBD, MI y Mii; Segmentación, mórula y blastocisto)
- μ = media general
- T_i = efecto de los tratamientos (T1=24h, T2=28h y T3=32h)
- e_{ij} = error asociado a cada observación.

IV. RESULTADOS

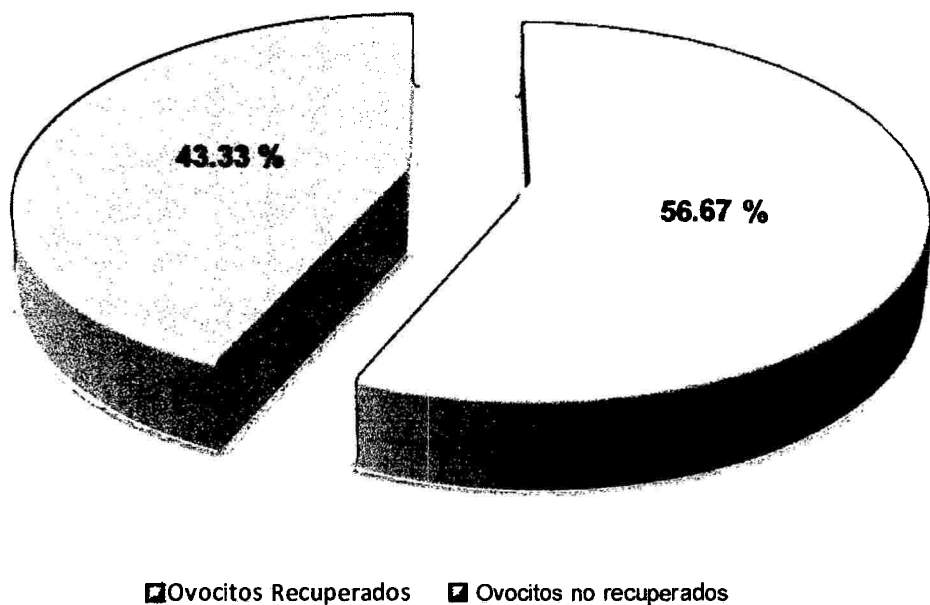
Tabla 01. Recuperación de ovocitos (media \pm SD) aspirados de folículos de 3 a 6 mm de ovarios de *Vicugna pacos* "alpaca". Camal Municipal de Huancavelica. (noviembre, 2011 – abril, 2012)

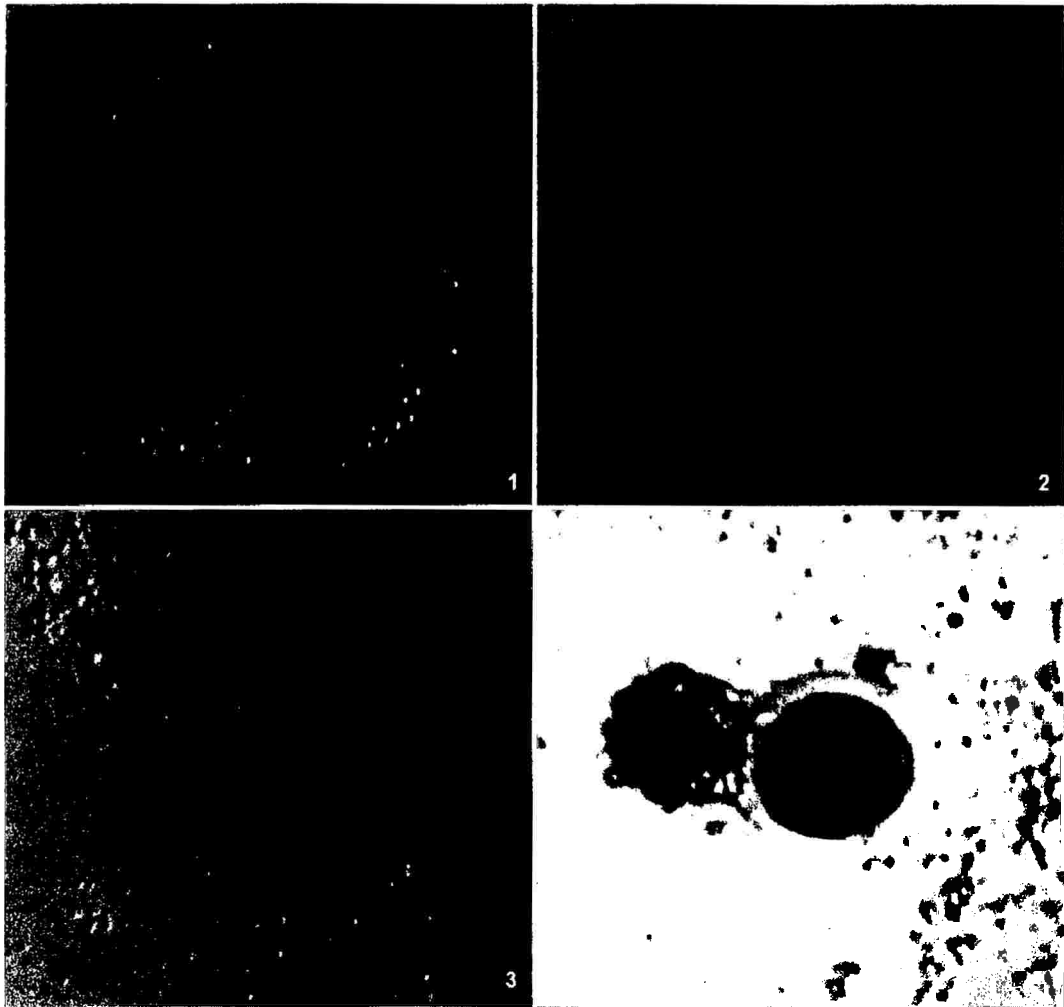
N° Total de Ovarios	173
N° Folículos aspirados	1551
N° Folículos / Ovario \pm SD	8.9 \pm 1.22
N° Ovocitos recuperados	862
% Recuperación de ovocitos \pm SD	56.67 \pm 12.04

Fuente: Elaboración propia

SD: Desviación estándar

Figura 01. Porcentaje de recuperación de ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca" luego de la aspiración folicular. Camal Municipal de Huancavelica. (noviembre, 2011 - abril, 2012)





Fuente: Elaboración propia

Figura 02. Categorías morfológicas de ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca". Microscopio óptico (Leica CME). Objetivo 20X. 1) Categoría I: Ovocito con células del cúmulo compacto, claro y transparente con más de cinco capas; 2) Categoría II: Ovocito rodeado por células del cúmulo, entre dos y cuatro capas 3) Categoría III: Ovocito parcialmente rodeado por células de cúmulo, entre uno y dos capas; 4) Categoría IV: Ovocito desnudo, rodeado sólo por la zona pelúcida.

Tabla 02. Categorización morfológica (media \pm SD) de ovocitos colectados de ovarios de *Vicugna pacos* "alpaca". Camal Municipal de Huancavelica (noviembre, 2011 – abril, 2012)

Replica	Categorías morfológicas (%)			
	Categoría I	Categoría II	Categoría III	Categoría IV
1	22.39	44.78	17.16	15.67
2	24.29	44.29	18.57	12.86
3	20.17	48.74	16.81	14.29
4	17.28	54.32	16.05	12.35
5	22.43	47.66	14.95	14.95
6	18.52	51.85	16.67	12.96
7	19.23	48.08	18.27	14.42
8	21.14	48.78	14.63	15.45
% \pm SD	19.75 \pm 4.10	49.49 \pm 4.99	16.64 \pm 1.41	14.12 \pm 1.26

Fuente: Elaboración propia.

SD: Desviación estándar

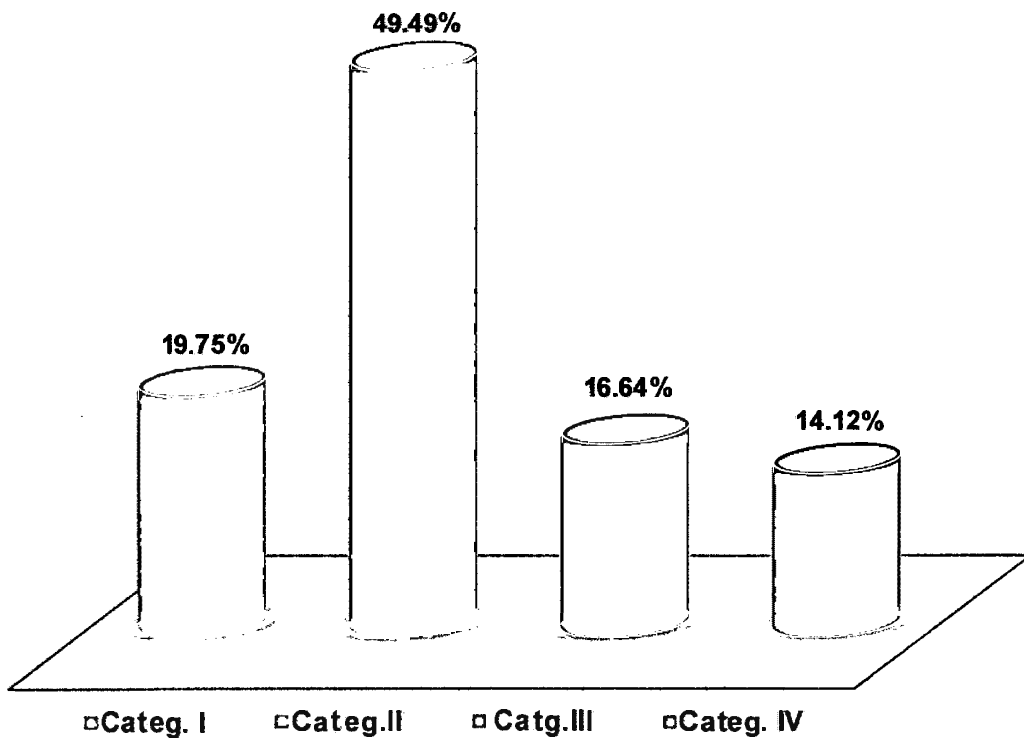


Figura 03. Categorización morfológica de ovocitos colectados de ovarios de *Vicugna pacos* "alpaca". Camal Municipal de Huancavelica (noviembre, 2011 - abril, 2012)

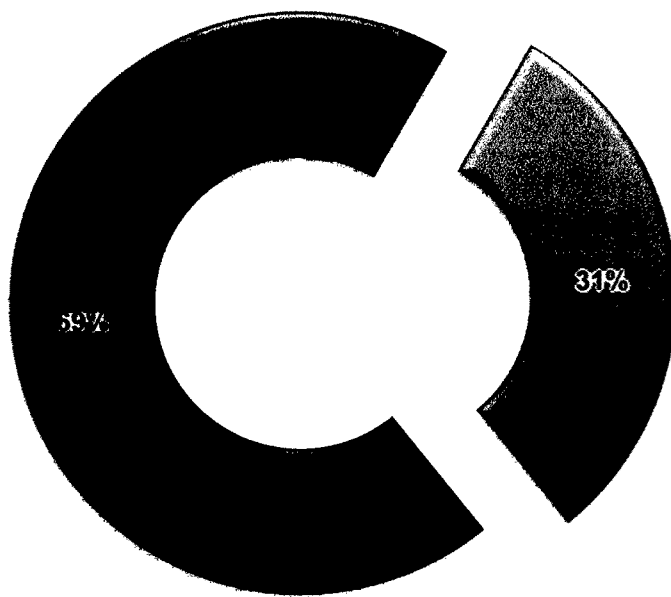
Tabla 03. Porcentaje y proporción (media \pm SD) de óvulos aptos y no aptos de ovarios de *Vicugna pacos* "alpaca". Camal Municipal de Huancavelica (noviembre, 2011 – abril, 2012)

Replica	N° OVR	N° OVT	OVA n(%)	OVNA n(%)	OVT/OVR	OVA/OVR	OVNA/OVR
1	26	134	90 (67.16)	44 (32.84)	5.15	3.46	1.69
2	20	140	96 (68.51)	44 (31.49)	7.00	4.80	2.20
3	20	119	82 (68.91)	37 (31.09)	5.95	4.10	1.85
4	16	81	58 (71.63)	23 (28.43)	5.06	3.63	1.44
5	18	107	75 (70.03)	32 (29.91)	5.94	4.17	1.78
6	18	54	38(70.37)	16 (29.63)	3.00	2.11	0.89
7	25	104	70 (67.31)	34 (32.69)	4.16	2.80	1.36
8	30	123	86 (69.92)	37 (30.08)	4.10	2.87	1.23
Media \pm SD			595 (69.24 \pm 1.54)	267 (30.76 \pm 1.54)	5.04 \pm 1.27	3.49 \pm 0.87	1.56 \pm 0.41

Fuente: Elaboración propia.

OVR: Ovarios; OVT/OVR: Ovocitos totales por ovario; OVA/OVR: Ovocitos aptos por ovario; OVNA/OVR: Ovocitos no aptos por ovario. No existen diferencias significativas ($p > 0.05$) dentro de los replicados. SD: Desviación estándar.

**Figura 04. Porcentaje de ovocitos aptos (OVA) y no aptos (OVNA) por ovario (OVR) de *Vicugna pacos* "alpaca".
Camal Municipal de Huancavelica
(noviembre, 2011 – abril, 2012)**



■ OVA/OVR ■ OVNA/OVR



Fuente: Elaboración propia.

Figura 05. Ovocitos de alpaca de categoría I y II clasificados como aptos para la maduración *in vitro*. Microscopio óptico (Leica CME). Objetivo 20X.

Tabla 04. Efecto del tiempo de maduración *in vitro* en el porcentaje (media \pm SD) de maduración nuclear de ovocitos colectados de ovarios de *Vicugna pacos* "alpacas". Camal Municipal de Huancavelica (noviembre, 2011 – abril, 2012)

Tiempo de Maduración <i>in vitro</i>	N° Total de Ovocitos (Réplicas)	Estadios de maduración nuclear						N° Ovocitos Degenerados (% \pm SD)
		N° Ovocitos Inmaduros (% \pm SD)			N° Ovocitos Maduros (% \pm SD)			
		VG	GVBD	M-I	M-I	M-II		
24 h	217 (10)	7 (2.81 \pm 2.70) ^a	4 (1.32 \pm 1.83) ^a	90 (40.71 \pm 11.64) ^a	97 (46.33 \pm 8.45) ^a	19 (8.83 \pm 4.46) ^a		
28 h	215 (10)	7 (2.87 \pm 3.15) ^a	4 (2.50 \pm 3.62) ^a	78 (37.91 \pm 9.74) ^a	110 (50.33 \pm 5.17) ^a	16 (6.39 \pm 4.60) ^a		
32 h	222 (10)	8 (3.71 \pm 4.87) ^a	5 (1.74 \pm 2.35) ^a	46 (22.42 \pm 8.48) ^b	148 (65.08 \pm 10.69) ^b	15 (7.05 \pm 4.40) ^a		

Fuente: Elaboración propia.

VG: Vesícula Germinal; GVBD: Vesícula Germinal Rota; M-I: Metafase I; M-II: Metafase II

^{a,b} Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). SD: Desviación estándar.

Tabla 05. Tasa de maduración nuclear (media \pm SD) de ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca" cultivados a diferentes tiempos. Camal Municipal de Huancavelica (noviembre, 2011 – abril, 2012)

Tiempo de maduración <i>in vitro</i>	N° Total de Ovocitos	N° Ovocitos (% \pm SD)		
		Inmaduros	Maduros	Degenerados
24 h	217	101(44.84 \pm 12.35) ^a	97 (46.33 \pm 8.45) ^a	19 (8.83 \pm 4.46) ^a
28 h	215	89 (43.28 \pm 7.99) ^a	110 (50.33 \pm 5.17) ^a	16 (6.39 \pm 4.60) ^a
32 h	222	59 (27.87 \pm 8.97) ^b	148 (65.08 \pm 10.69) ^b	15 (7.05 \pm 4.40) ^a

Fuente: Elaboración propia.

Madurados: Ovocitos que alcanzaron un estadio de Metafase II (M-II); Inmaduros: Ovocitos que presentaron un estadio de Vesícula Germinal (VG), Vesícula Germinal Rota (GVBD) y Metafase I (M-I).

^{a,b} Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). SD: Desviación estándar.

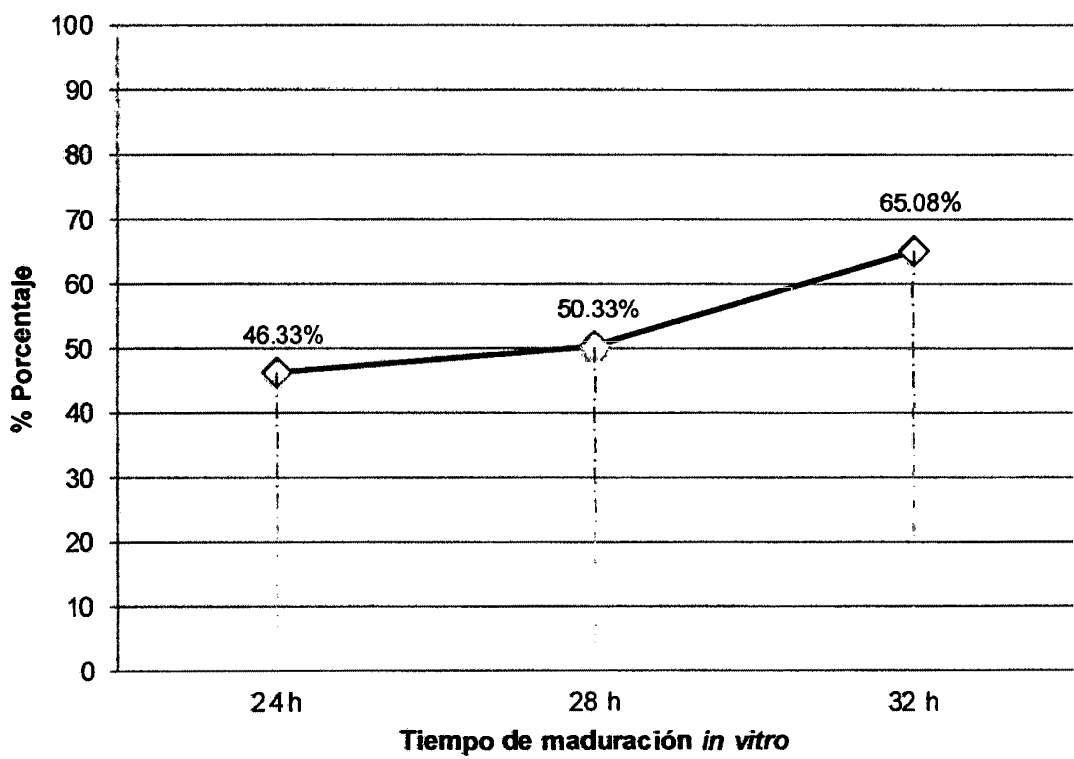


Figura 06. Porcentaje de ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca" en Metafase II (M-II) después de 24, 28 y 32 h de cultivo *in vitro*.

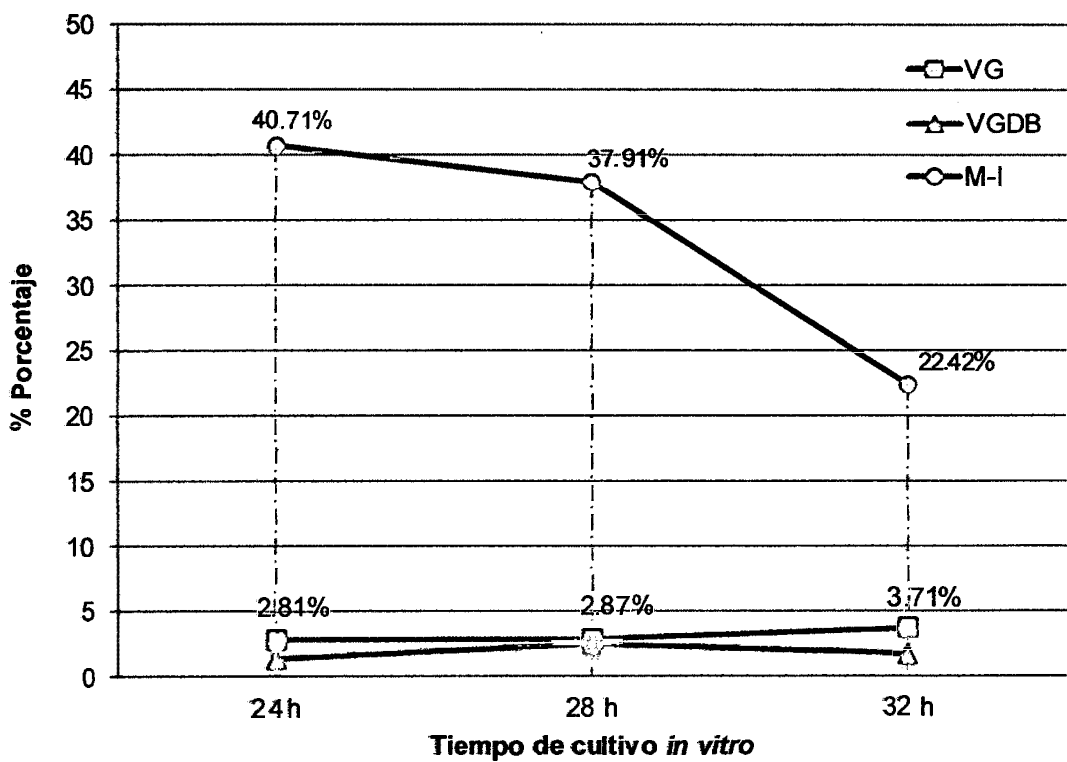


Figura 07. Porcentaje de ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca" en estadio de Metafase I (M-I), Vesícula Germinal (VG) y Vesícula Germinal Rota (GVBD) después de 24, 28 y 32 h de cultivo *in vitro*.

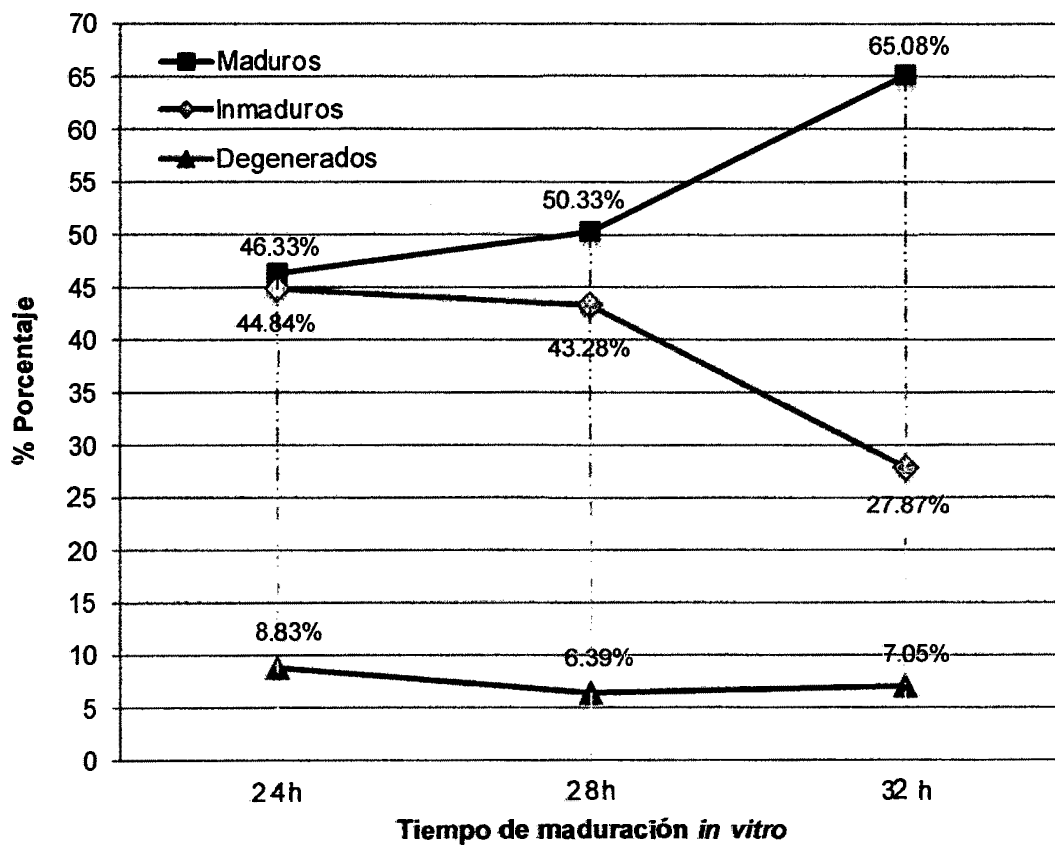


Figura 08. Porcentaje de ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca" maduros, inmaduros y degenerados después de 24, 28 y 32 h de cultivo *in vitro*.

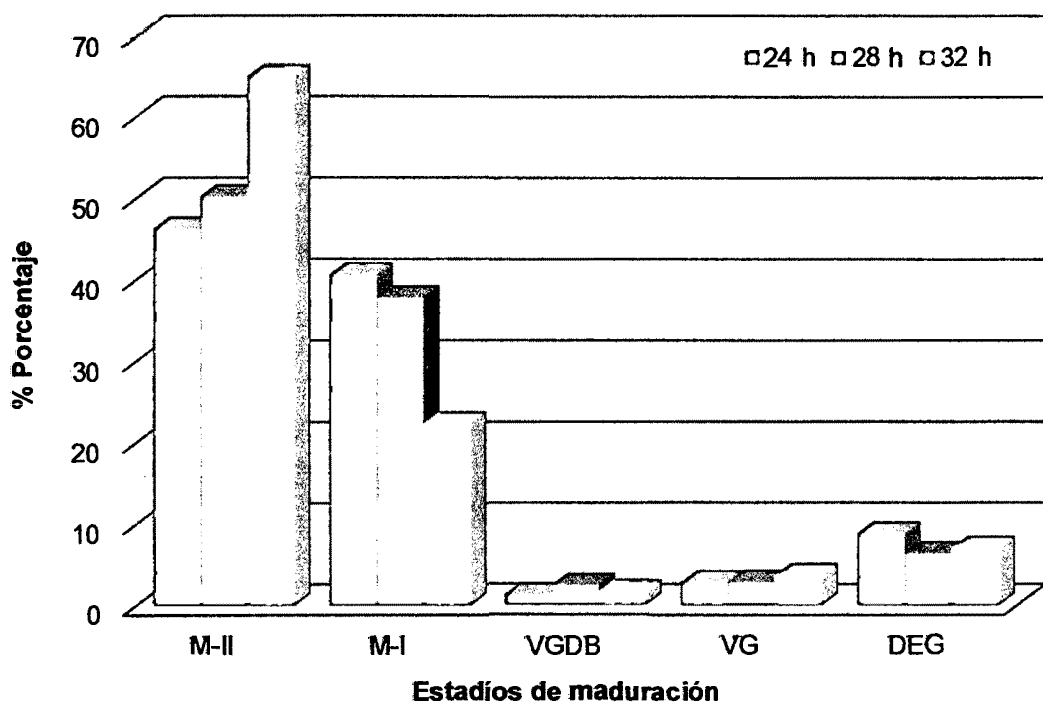
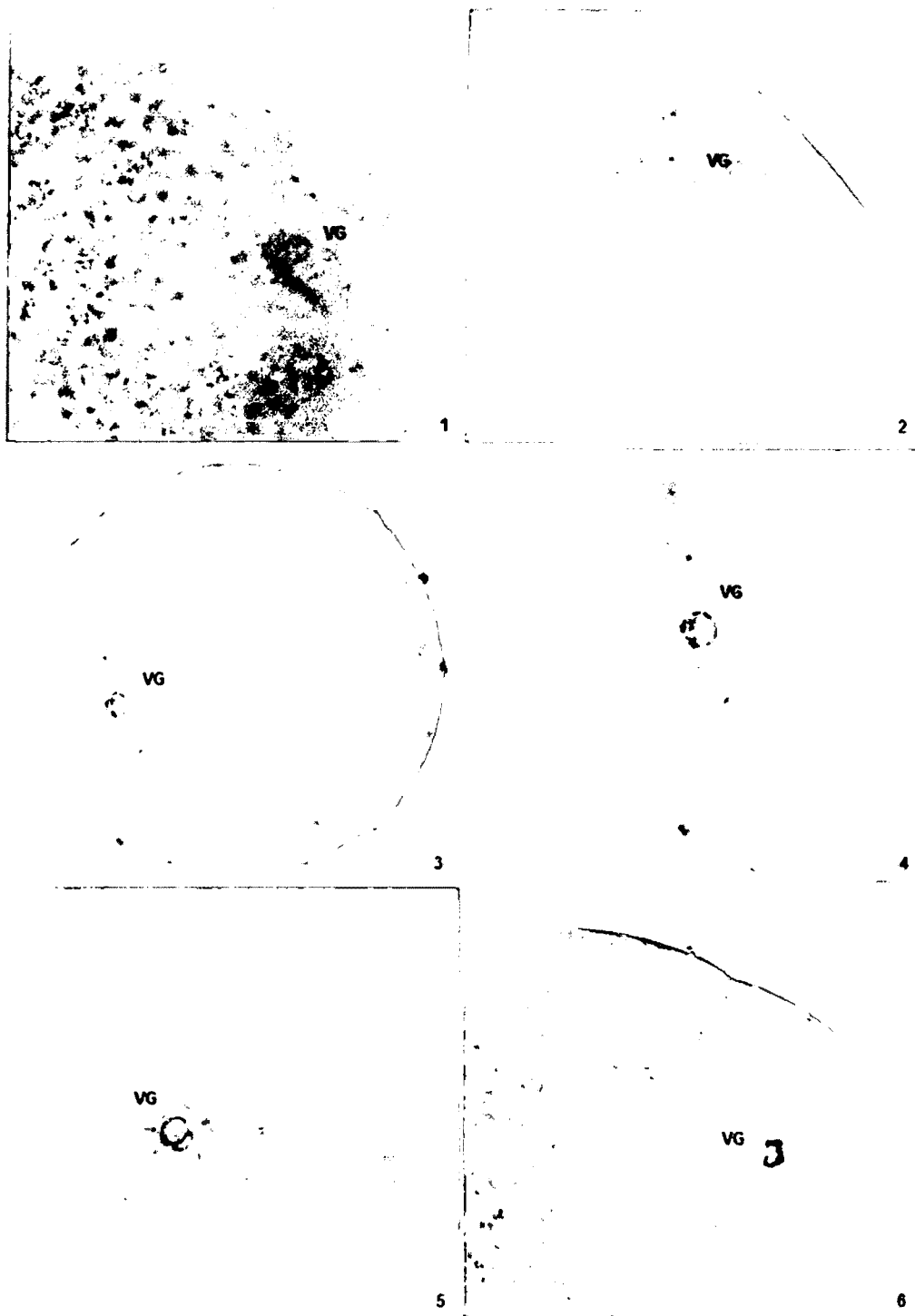
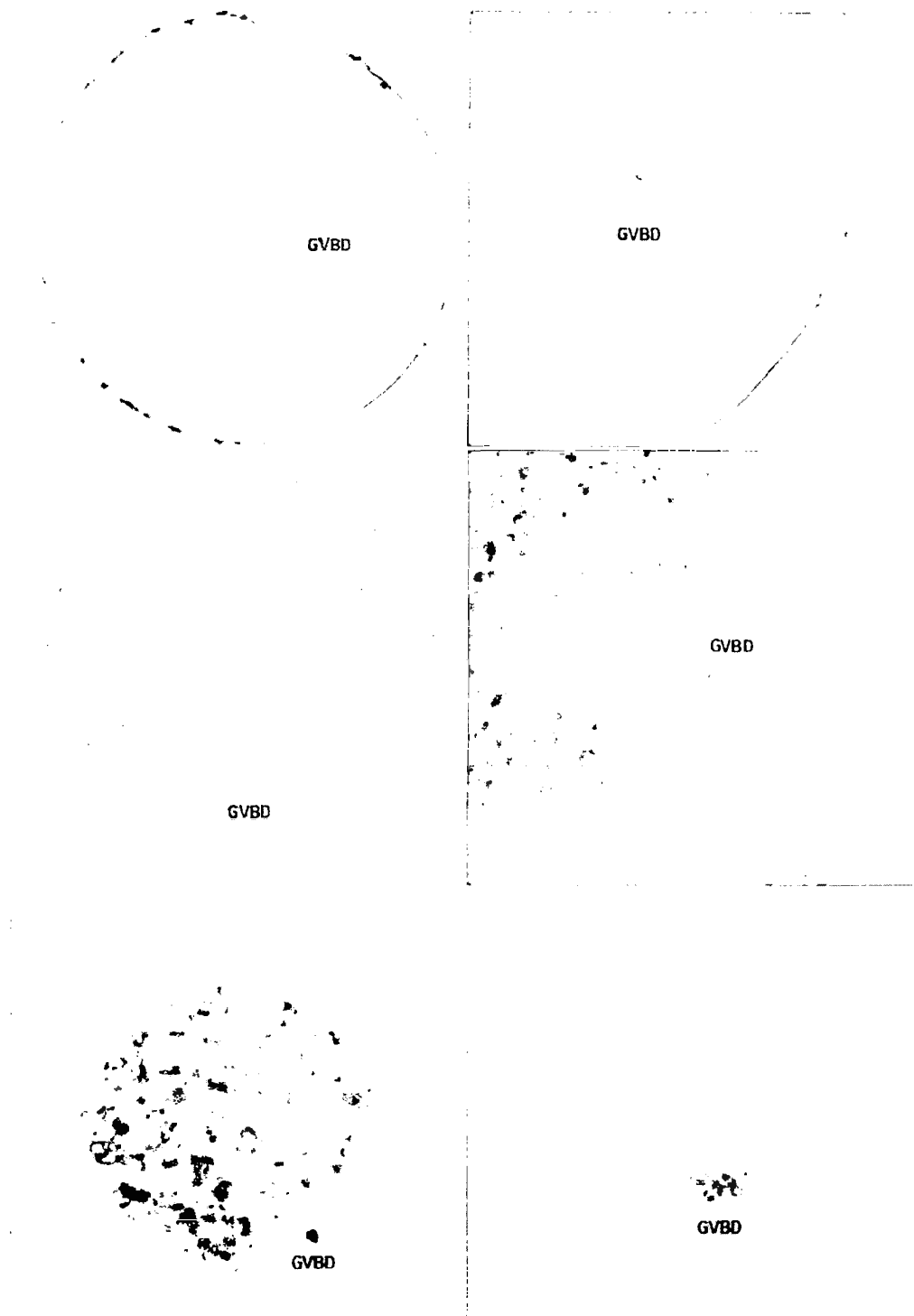


Figura 09. Porcentaje de ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca" en estadio de Metafase II (M-II), Metafase I (M-I), Vesícula Germinal Rota (GVBD), Vesícula Germinal (VG) y degenerados.

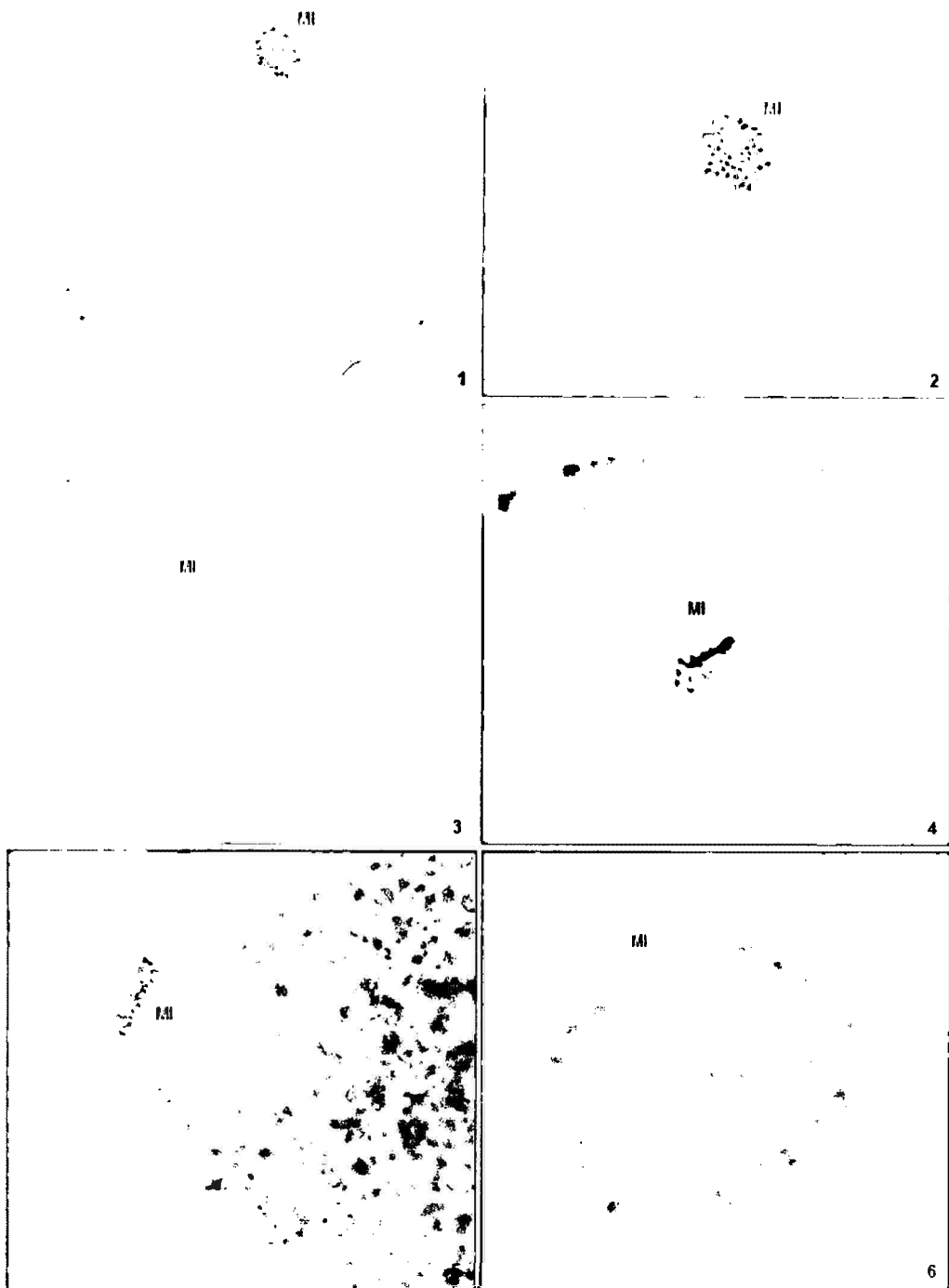


Fuente: Elaboración propia.

Figura 10. Ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca" en estadio de Vesícula Germinal (VG). Tinción con orceína acética al 1%. Microscopio óptico (Leica CME). Objetivo 40X. 1-2-3-4) VG-0: nucléolo evidente y cromatina filamentososa localizada en toda el área; 5) VG-I: nucléolo evidente y cromatina dispuesta en forma de herradura de caballo alrededor del nucléolo; 6) VG-II: nucléolo evidente con cromatina en forma de herradura de caballo alrededor del nucléolo, pero con algunos agregados de cromatina teñidos.

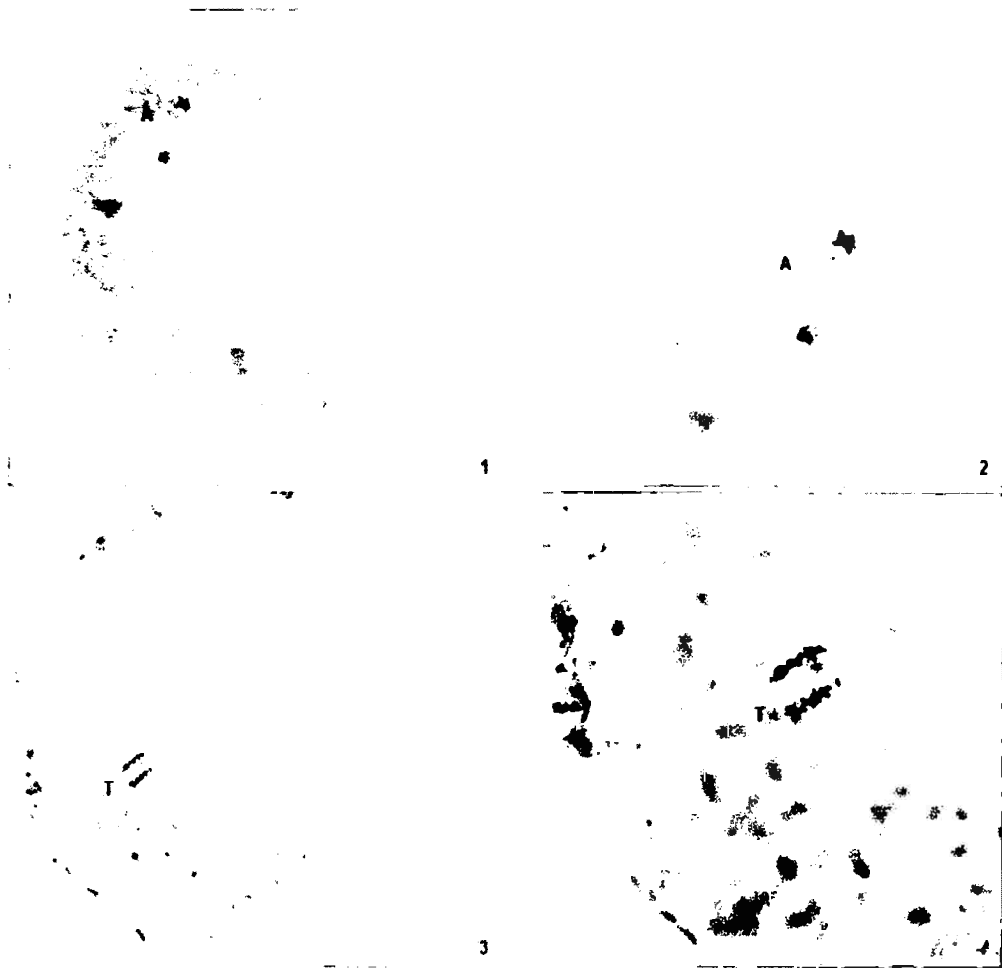


Fuente: Elaboración propia.
Figura 11. Ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca" en estadio de Vesícula Germinal Rota (GVBD). Tinción con orceína acética al 1%. Microscopio óptico (Leica CME). Objetivo 40X. GVBD: ausencia de la vesícula germinal, condensación de cromosomas bivalentes.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 12. Ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca" en estadio de Metafase I (M-I). Tinción con orceína acética al 1%. Microscopio óptico (Leica CME). Objetivo 40X. M-I: Cromosomas dispuestos en el ecuador del huso acromático 1-2-3) Metafase I vista frontalmente; 4-5) Metafase I vista lateralmente, es notorio la formación del huso acromático; 6) Placa metafásica completa, presencia de 74 cromosomas ($2n=74$).



Fuente: Elaboración propia.

Figura 13. Ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca" en estadio de Anafase (A) y Telifase (T). Tinción con orceína acética al 1%. Microscopio óptico (Leica CME). Objetivo 40X. 1-2) Ovocitos en Anafase I con los cromosomas desplazándose hacia los polos del huso acromático; 3-4) Ovocitos en Telifase I con los cromosomas en el polo del huso acromático.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 14. Ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca" en estadio de Metafase II (M-II). Tinción con orceína acética al 1%. Microscopio óptico (Leica CME). Objetivo 40X. Cromosomas en metafase II (M) dispuestos en el segundo huso acromático y presencia del primer corpúsculo polar (CP).

Tabla 06. Efecto del tiempo de maduración *In vitro* de ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca" en el porcentaje (media \pm SD) de desarrollo embrionario luego de la fecundación *in vitro*.

Tiempo de maduración <i>in vitro</i>	N° Total de Ovocitos inseminados (Replicas)	Estadios del desarrollo embrionario (% \pm SD)			
		Segmentación (48 horas)	Mórula (4 días)	Blastocisto (7 días)	
24 h	392 (11)	163/392 (41.55 \pm 3.65) ^a	111/163 (68.23 \pm 5.75) ^a	18/163 (11.03 \pm 2.08) ^a	
28 h	456 (11)	217/456 (47.54 \pm 2.91) ^b	154/217 (71.06 \pm 5.84) ^a	31/217 (14.19 \pm 1.70) ^b	
32 h	368 (11)	221/368 (60.17 \pm 3.09) ^c	153/221 (69.39 \pm 9.31) ^a	38/221 (17.02 \pm 2.14) ^c	

Fuente: Elaboración propia.

^{a,b} Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

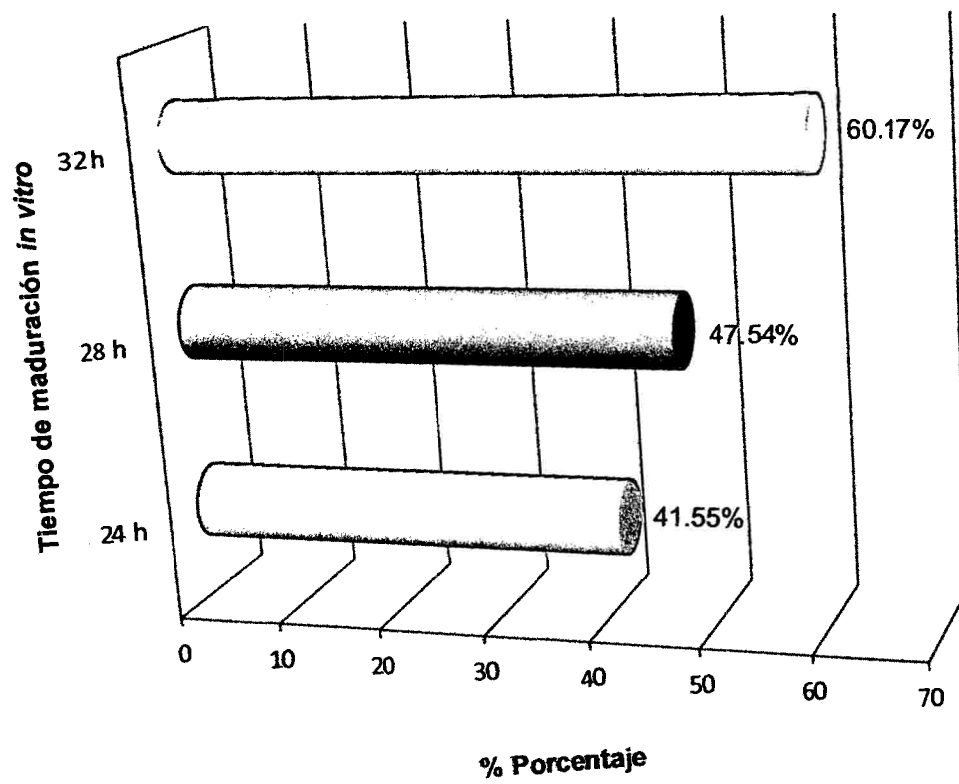


Figura 15. Porcentaje total de embriones segmentados luego de 48 h de fecundación *in vitro*.

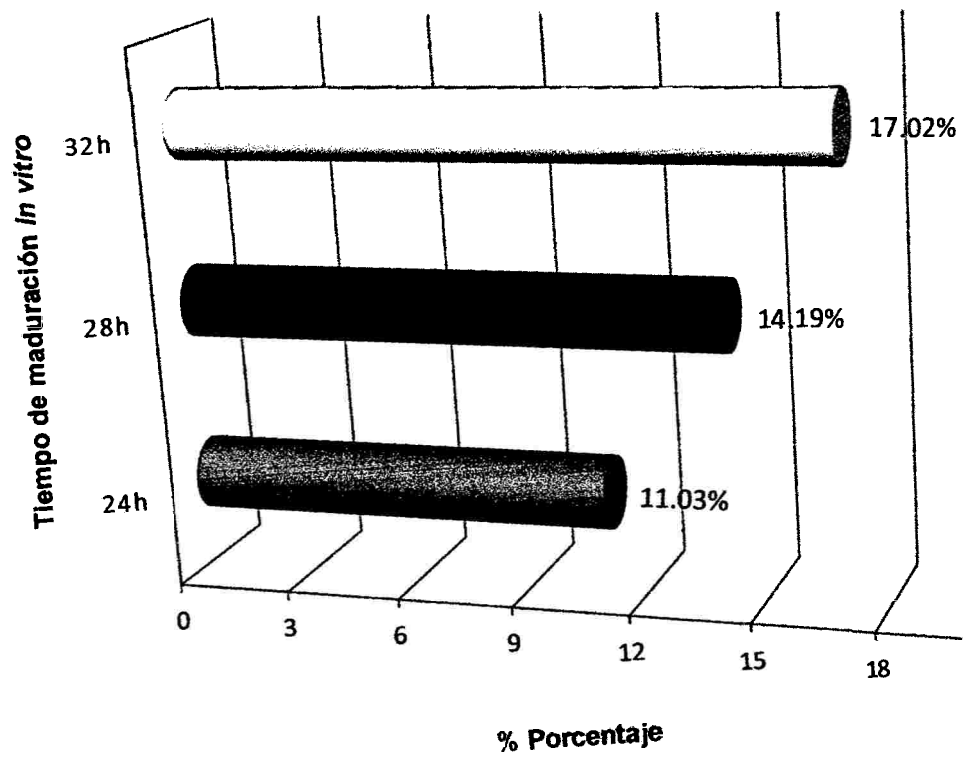
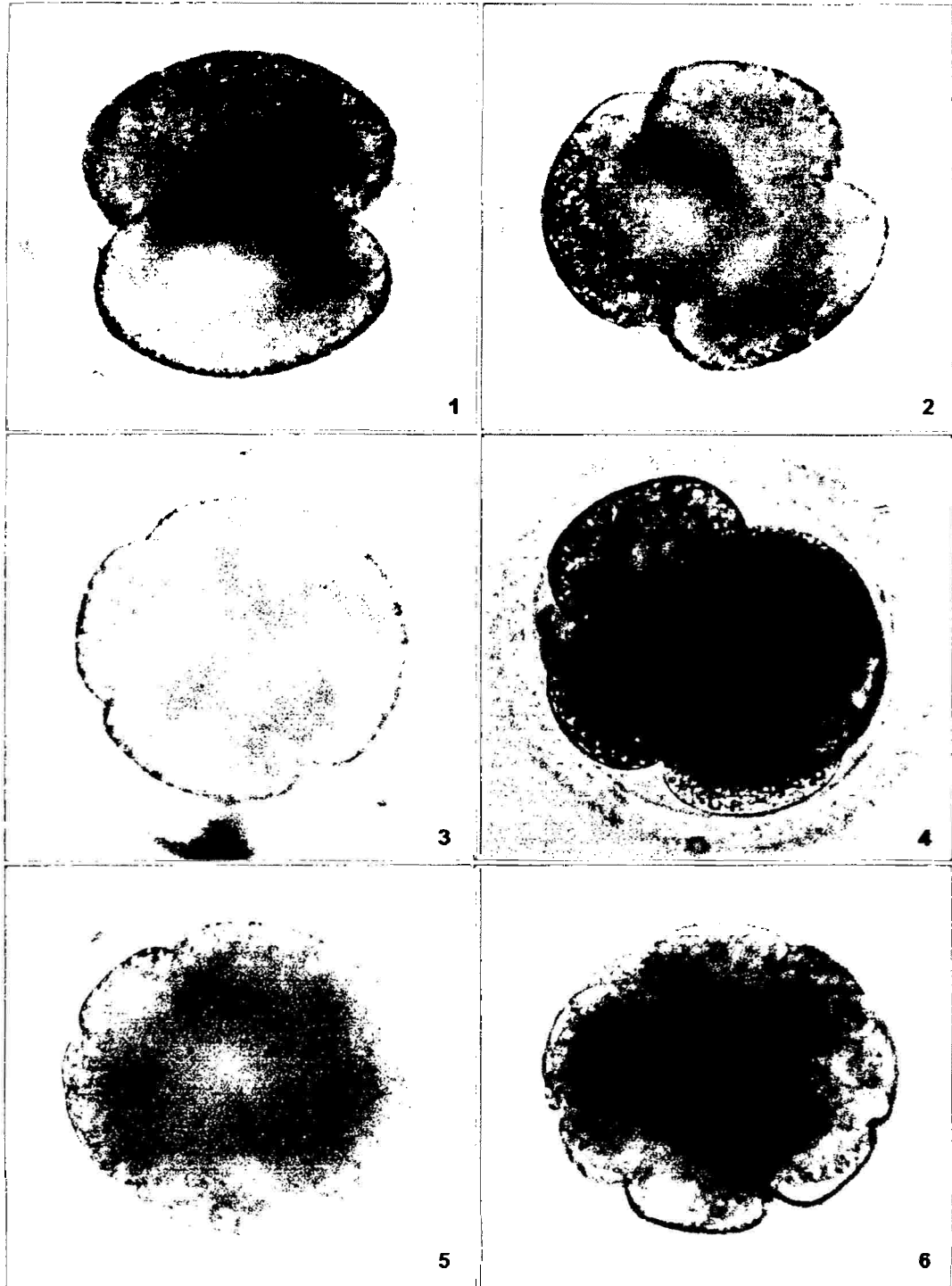
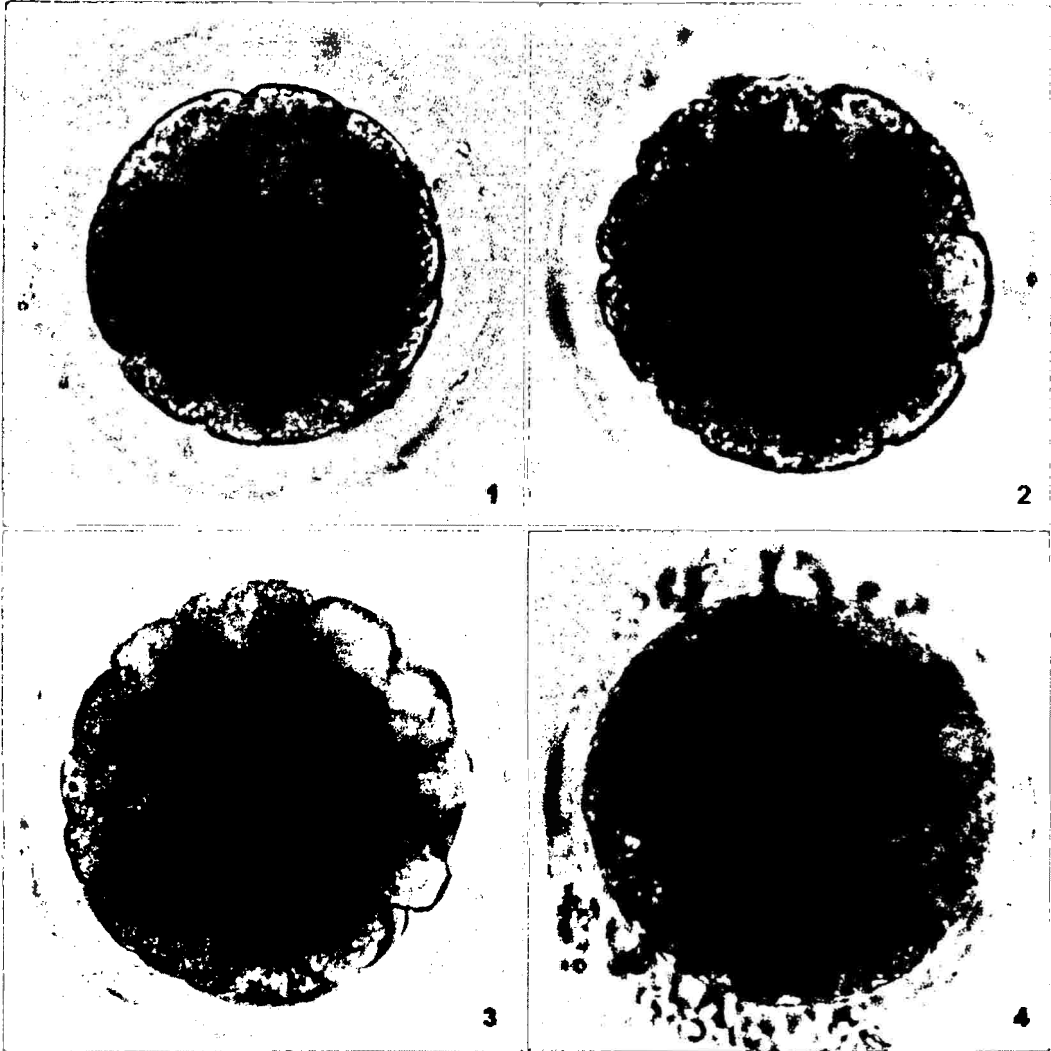


Figura 16. Porcentaje total de embriones en estadio de blastocisto expandido luego de 7 días de la fecundación *in vitro*.



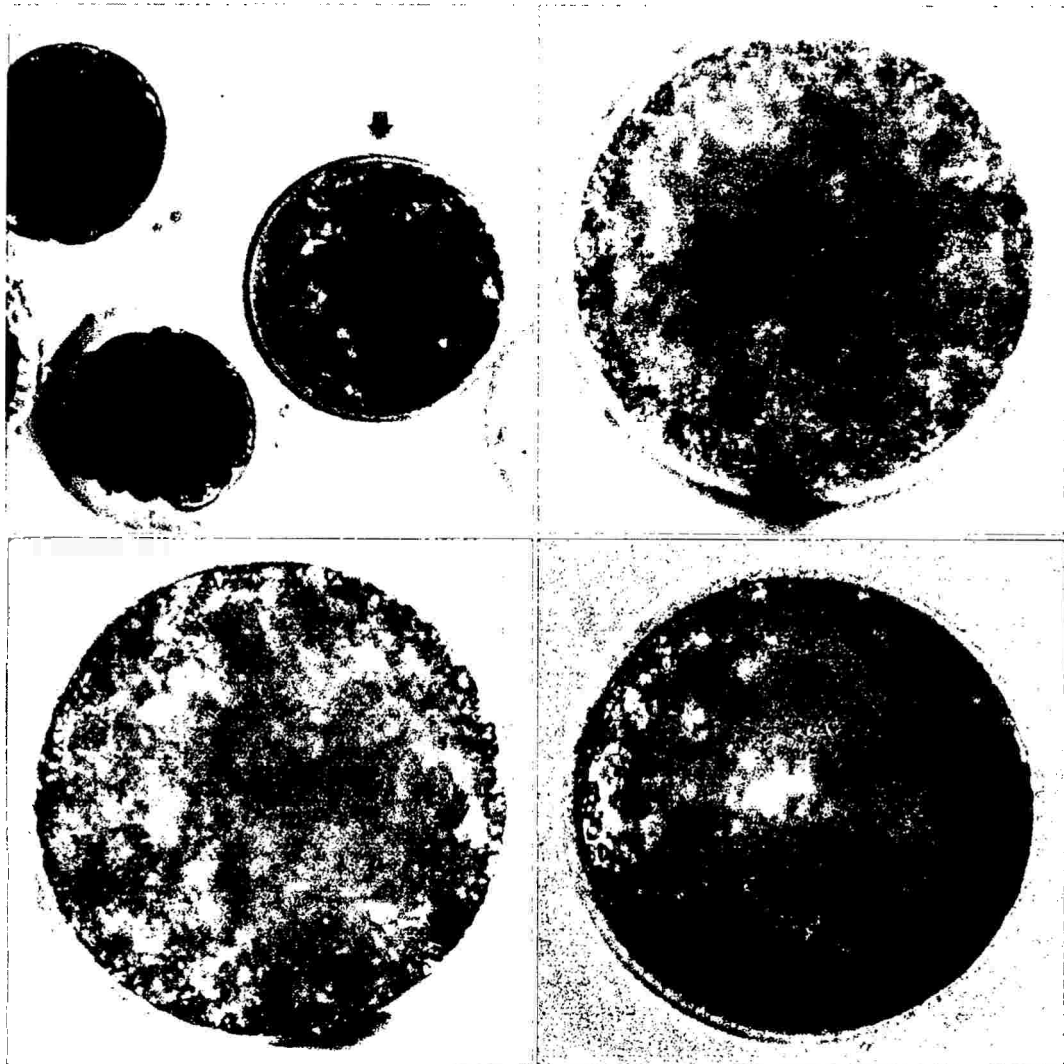
Fuente: Elaboración propia.

Figura 17. Embriones de *Vicugna pacos* "alpaca" en estadio de segmentación. Microscopio invertido (Novel Ningbo XDS-403AT). Objetivo 40X. 1) Embrión de dos células; 2) Embrión de tres células; 3) Embrión de cuatro células; 4) Embrión de cinco células; 5) Embrión de seis células; 6) Embrión de más de ocho células



Fuente: Elaboración propia.

Figura 18. Embriones de *Vicugna pacos* "alpaca" en estadio de Mórula. Microscopio invertido (Novel Ningbo XDS-403AT). Objetivo 40X. 1-2) Mórula temprana; 3-4) Mórula compacta.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 19. Embriones de *Vicugna pacos* "alpaca" en estadio de blastocisto expandido. Microscopio invertido (Novel Ningbo XDS-403AT). Objetivo 40X. Nótese el aumento de tamaño en un 150% y el adelgazamiento de la zona pelúcida.

V. DISCUSIONES

5.1. Recuperación de ovarios y selección de ovocitos

La recuperación de ovarios y la selección de ovocitos, representan la etapa inicial de este proceso. En general, los ovarios recuperados en el Camal, provienen de hembras de diferentes edades y condiciones fisiológicas. Así, Leibfried y First (1979) demostraron que la capacidad de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos no depende del momento del ciclo estral en que son obtenidos los folículos. De este modo, en el presente estudio, la recuperación de ovarios de alpacas se realizó del total de hembras sacrificadas en el Camal Municipal de Huancavelica las que fueron empleados al azar como donantes de ovocitos, para cuyo efecto, se consideró los criterios: oportunidad y cantidad de beneficios.

La apariencia de la superficie de los folículos, ha sido propuesta como una característica importante para la preselección de los ovocitos, permitiendo mejorar los índices de maduración y fertilización *in vitro* (Grimes e Ireland, 1986). En los Camélidos Sudamericanos, a parte de los folículos normal, se ha descrito la presencia de folículos quísticos (Bravo, 1997; Sumar, 1983) y hemorrágicos (Adams y col., 1991; Tibary y Anouassi, 1997), ambas estructuras con similitudes y diferencias, pero desconocidas en sus efectos sobre la función reproductiva.

Sobre la base de estas teorías, en el presente estudio, se seleccionaron y aspiración 1551 folículos de superficie clara provenientes de 173 ovarios (OVR) de alpaca recolectados del Camal Municipal de Huancavelica, lo que produjo una cifra media de 8.9 ± 1.22 folículos por ovario (máximo 30 - mínimo 1), se descartó inmediatamente aquellos que presentaban folículos quísticos y hemorrágicos. Por otro lado, del total de folículos aspirados se recuperaron 862 ovocitos (OVT) (Tabla 01), lo que supone un 56.67% de recuperación de ovocitos con respecto al número total de folículos ováricos aspirados (Figura 01).

Diversos autores, señalan que el número total de ovocitos obtenidos por ovario, varía de acuerdo al método de recolección utilizado. De este modo, Del Campo y col. (1992; 1994) utilizando dos metodologías diferentes de recolección de ovocitos, lograron recuperar para el método de desmenuzados de tejido ovárico un total de 27 ovocitos por llama; mientras que con la metodología de aspiración folicular se recuperó 6.4 ovocitos por llama, deduciéndose que la mayor tasa de recuperación esta dada por el método de desmenuzados.

Sin embargo, algunos autores (Iwazaki y col., 1987; Hamano y Kuwayana, 1993) señalan que el método de corte, produce la incisión al azar tanto de la superficie ovárica como el interior. Este hecho deriva en liberación de ovocitos de folículos menores a 2 mm de diámetro, cuya capacidad de maduración *in vitro* es menor en comparación a los ovocitos obtenidos de folículos de mayor diámetro.

En este estudio se eligió la aspiración folicular porque se consideró, como factor muy importante, la rapidez en la obtención de los ovocitos ya que, este proceso, exige que las condiciones de temperatura y pH varíen lo menos posible desde que se obtienen los ovarios hasta que los ovocitos se introduzcan en el medio de maduración.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, indican que el número promedio de ovocitos aspirados por ovario de alpaca fue de 5.04 ± 1.27 (Tabla 03). Estos resultados se ubican en un rango superior a lo informado por Ruiz y col. (2007)

que reportaron un total de 3.5 COCs/ovario; pero inferior a lo reportado por Gamarra y col. (2008) que obtuvieron una media de 8.5 ovocitos/ovario de alpaca. Es importante señalar que esta variabilidad puede estar motivada por la experiencia del operador en la colección de los ovocitos y a las variaciones propias de los ovarios (edad del animal, raza y estado reproductivo).

De todos los ovocitos recuperados, en este estudio, se seleccionaron como aptos (OVA) para la maduración y fecundación *in vitro* un total de $69.24 \pm 1.54\%$ (Figura 04), divididos en dos categorías morfológicas (I y II) (Figura 02 y 05). Este valor, es similar al 69% obtenido por Ruiz y col. (2007); pero inferior al 89% y 81% indicados por Ratto y col. (2007) y Gamarra y col. (2008) respectivamente.

Por otra parte, Leibfried y First (1979) informan que la estructura que presentan los ovocitos recogidos de los ovarios, brinda la posibilidad de predecir su capacidad de reiniciar la meiosis. De este modo, dichos autores proponen la posibilidad de seleccionar los ovocitos basados en su apariencia general (células del cúmulus y apariencia del citoplasma). Así se ha podido clasificar los COCs en cuatro categorías (Figura 02) y se ha demostrado que las categorías I y II, representado por ovocitos rodeados completamente por más de tres capas de células del cúmulus, así como la apariencia homogénea y compacta del ooplasma, tienen la mayor capacidad de maduración *in vitro*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, indican que sobre un total de 862 ovocitos colectados, seleccionados y clasificados, se obtuvieron $19.75 \pm 4.10\%$ de ovocitos en categoría I, $49.49 \pm 4.99\%$ categoría II, $16.64 \pm 1.41\%$ categoría III y $14.12 \pm 1.26\%$ categoría IV, estos dos últimos fueron considerados como no aptos (OVNA) para la maduración y fecundación *in vitro*, por su baja viabilidad en el desarrollo embrionario (Tabla 02 y Figura 03). Estos valores difieren con el trabajo reportado por Ramos (2009), posiblemente debido a que en dicho trabajo el tamaño de muestra fue bajo. Otros autores (Mendoza y col.,

2008), utilizaron también diferentes categorías morfológicas, principalmente la I y II sin mostrar resultados de la selección y clasificación.

El número de ovocitos aptos y no aptos por ovario fue de 3.49 ± 0.87 y 1.56 ± 0.41 respectivamente (Tabla 03). La relación existente entre los ovocitos aptos y no aptos por ovario obtenido, está directamente relacionada con las tres variables involucradas: recolección y transporte de los ovarios, métodos e instrumental empleados para la obtención de los ovocitos y el correcto criterio empleado para su selección. En este sentido, el entrenamiento adecuado del operador, la calidad y procedencia del material originario (ovarios) son importantes a la hora de evaluar resultados.

El análisis estadístico (media y desvío estándar) de los caracteres analizados (OVT/OVR, OVA/OVR y OVNA/OVR), indica que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las 8 réplicas (Tabla 03).

5.2. Evaluación del estado nuclear de los ovocitos

Como se ha señalado en la primera parte, el objetivo de este estudio fue determinar el tiempo óptimo de maduración nuclear *in vitro* de ovocitos de alpaca, dada la escasez de literatura existente al respecto.

La información concerniente a este tema, indica que la maduración de ovocitos de mamíferos está implicada estrechamente en tres sucesos importantes: la progresión meiótica, la regulación de la penetración espermática y la descondensación de la cabeza del espermatozoide (Swain y Smith, 2007). Por todo esto, la adquisición de la capacidad de desarrollo por parte de los ovocitos madurados *in vitro* es un factor limitante para que se puedan alcanzar con éxito las fases de fecundación, división y desarrollo embrionario (Eppig y col., 1994).

Otra de las causas resaltantes de la importancia de determinar el tiempo óptimo en la maduración *in vitro* de ovocitos se ilustra, también, mediante los resultados

de los estudios en animales que muestran que el envejecimiento de ovocitos puede ser la causa de la fertilidad reducida si la inseminación *in vivo* se retrasa (Hunter, 1989). Además, el retraso de la inseminación *in vitro* se ha asociado con la capacidad del ovocito de ser fertilizado pero no llegar a desarrollarse hasta estados embrionarios superiores, esto como resultado de los trastornos en los gránulos corticales y los microtúbulos (Long y col., 1994).

En cuanto al criterio de maduración nuclear, diversos autores han considerado, como ovocito maduro, aquel que se encuentre en el estadio de metafase II. Algunos trabajos designan como ovocitos madurados a aquellos en los que se produjo la desaparición de la vesícula germinal (GVBD), incluyendo los estadios de GVBD, metafase I, Anafase I y Telofase I, además de la metafase II (Dekel y Scherzly, 1985; Feng y col., 1988; Downs y col., 1988; Downs S., 1989; Armstrong y col., 1991; Brucker y col., 1991). Sin embargo, en este estudio, se estableció el criterio de maduración de ovocitos en el estadio de metafase II, ya que es el estadio al que tiene que llegar el ovocito antes de la fecundación en condiciones *in vivo* y, por lo tanto, el más apropiado para valorar, con la máxima certeza, el éxito de la progresión meiótica durante la maduración *in vitro*.

En el presente estudio se evaluó el efecto del tiempo de maduración *in vitro* sobre el porcentaje de maduración nuclear de ovocitos de alpaca, estableciéndose para esto, tres tiempos de cultivo específicos: 24, 28 y 32 h; de esta manera, se pudo obtener los valores porcentuales del total de ovocitos en cada estadio meiótico alcanzado (Vesícula Germinal, Vesícula Germinal Rota, Metafase I y Metafase II) (Tabla 04 y 05). Así se observó que, tras 32 h de cultivo, la tasa de maduración nuclear en estadio de metafase II (ovocitos maduros) (Figura 14) alcanzó un $65.08 \pm 10.69\%$, seguida de un $50.33 \pm 5.17\%$ a las 28 h y finalmente un $46.33 \pm 8.45\%$ a las 24 h de cultivo *in vitro* (Figura 06). En cuanto a la media porcentual de ovocitos inmaduros en el estadio de metafase I (M-I) (Figura 12) se observó una disminución gradual hacia el mayor

tiempo de cultivo, es decir, disminuyó de un $40.71 \pm 11.64\%$ (24 h) a un $22.42 \pm 8.48\%$ (32 h) (Figura 07 y 08). Para los ovocitos en estadio de Vesícula Germinal (VG) (Figura 10), Vesícula Germinal Rota (GVBD)(Figura 11) y degenerados, se obtuvo una tasa promedio de 3.13%, 1.85% y 7.57% respectivamente; notándose una tendencia paralela en los tres tiempos de cultivo (Figura 07).

Existen pocas publicaciones sobre este tema. Huanca y col. (2009), utilizando tres tiempos para la maduración *in vitro* de ovocitos en medio TCM-199 suplementado con FCS 10% (v:v), FSH 0.5 mg/ml, hCG 10 ml/g, 0.2 mM de piruvato sódico, 50 mg/ml de gentamicina y 1 mg/ml estradiol, lograron obtener 18.9%, 42.9% y 65.8% de ovocitos en metafase II (M-II) a las 30, 34 y 38 h de cultivo, respectivamente. Así mismo, Condori y col. (2010) utilizando 42 h de maduración *in vitro* de ovocitos en medio TCM-199 suplementado con 10% FCS, 10 mg/ml de hCG, 0.2 mM piruvato de sodio, 50 mg/ml de gentamicina, 1 mg/ml de estradiol y 0.5 mg/ml de FSH, obtuvieron 64.9% de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II.

Comparando dichas investigaciones con los resultados obtenidos en este estudio, se observó una diferencia marcada en el porcentaje de maduración nuclear de ovocitos (M-II) a las 28 y 32 h. Notándose que los resultados que se presentan en este estudio superan altamente a los valores obtenidos por Huanca y col. (2009), pero se asemejan al resultado obtenido por Condori y col. (2010). Probablemente estas diferencias se deben a factores como: características de las hembras sacrificadas en el camal, el tiempo de transporte de las muestras al laboratorio y, sobre todo, a la selección y clasificación de ovocitos recogidos tras la punción folicular; se descarta la posibilidad de la influencia del medio de maduración, pues en los dos estudios se utilizaron los mismos componente para su preparación.

Otros autores han evaluado la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca, luego de la superovulación de hembras con FSH y eCG. Gómez y col. (2002),

utilizando 26 h para la MIV de ovocitos recuperados por laparotomía ventral, obtuvieron 46% (FSH) y 40% (eCG) de ovocitos en metafase II. Ratto y col. (2007) mejoró los resultados obtenidos por Gómez alcanzando 82% y 64% de ovocitos en metafase II para los mismos tratamientos superovulatorios.

En otra especie de Camélidos Sudamericanos, específicamente en llamas (*Lama glama*), Del Campo y col. (1992), utilizando un tiempo de 36 h de maduración *in vitro*, obtuvieron 62% de ovocitos en estadio de metafase II. En otra investigación, Del Campo y col. (1994) luego de 30 h de MIV, obtuvieron 30% de ovocitos en metafase II. Así mismo, Ratto y col. (1999) utilizando un protocolo similar a las anteriores investigaciones mejoraron sustantivamente los resultados. En este trabajo evaluaron 26, 30 y 36 h de maduración *in vitro* de COCs, obteniendo 58%, 73% y 75% de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II. Por otro lado, Miragaya y col. (2002) utilizaron un tiempo de 27-30 h para la maduración de COCs, obtuvieron 62% y 74% de ovocitos en metafase II, recuperados sin superovulación y con superovulación respectivamente. En otro estudio, Ratto y col. (2005), encontraron 77.7%, 80.6% y 80.4% de ovocitos maduros cuando utilizaron 28, 30 y 36 h para la MIV. Por otro parte, Sansinema y col. (2003) introduciendo LH en su protocolo de maduración, obtuvieron 52% de ovocitos maduros. Posteriormente el mismo grupo de investigación (Sansinema y col., 2007) utilizó un medio diferente para la MIV (TCM-199, 5 µg/ml de FSH, 10 µg/ml de LH, 10 mg/ml de EGF, 10 mg/ml de IGF-1 y 1 µg/ml de estradiol y 10% de FCS) mejorando su anterior resultado con 74% de ovocitos en metafase II luego de 30 h de MIV.

El estudio estadístico de las variables analizadas en la maduración *in vitro* de ovocitos, demuestra que no existen diferencias significativas entre los dos primeros tiempos 24 y 28 h, pero sí a las 32 h de cultivo. Estos resultados indican que el tiempo óptimo para la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca, en este estudio, es de 32 h.

5.3. Fertilización y evaluación del desarrollo embrionario *in vitro*

Una vez conseguida la maduración *in vitro* de los ovocitos, una de las formas más eficaces, para demostrar si dicha maduración se produjo correctamente, es comprobar la capacidad de estos ovocitos para ser fecundados *in vitro* y alcanzar con éxito las fases de división y desarrollo embrionario.

La mayoría de los trabajos realizados en fertilización *in vitro* de Camélidos Sudamericanos, utilizan semen epididimario para el cocultivo con los ovocitos madurados *in vitro*. El procesamiento del semen incluye el lavado, la selección y la capacitación de las células espermáticas.

En el presente estudio, se ha realizado el lavado del semen epididimario por medio de centrifugaciones consecutivas a 1500 rpm, y utilizando la técnica de Swim-up se seleccionaron y capacitaron espermatozoides.

Referente al cocultivo, Ling y Lu (1990) informaron que pueden cocultivarse hasta 50 ovocitos por microgota de 50 ml de medio de cultivo sin que ello signifique reducir los porcentajes de fertilización *in vitro*. Así mismo, Saeki y col. (1995) analizaron el efecto de la concentración espermática sobre los resultados obtenidos en la fertilización *in vitro* de ovocitos. Estos autores, demostraron que el incremento en la concentración espermática de 10^4 espermatozoides/ml a 10^6 espermatozoides/ml por cada 10 ovocitos favorece los índices de fertilización.

Sobre la base de estas investigaciones, en este estudio se ha empleado una relación de 10 a 15 ovocitos/gota y $1.5 - 2 \times 10^6$ espermatozoides/ml, teniendo en cuenta que se ha utilizado los resultados de la especie bovina como referencia, pues no existe bibliografía alguna sobre estos estudios en Camélidos Sudamericanos.

Se ha sugerido que el tiempo óptimo de incubación de los ovocitos con los espermatozoides para lograr la máxima tasa de fertilización, tras la maduración

in vitro y fertilización *in vitro*, sea de 18 a 20 h (Long y col., 1993). Del mismo modo Rehman y col. (1994), sugieren un tiempo de incubación de 24 h, destacando que periodos menos a 16 h pueden resultar en una reducción de la tasa de fertilización.

En Camélidos Sudamericanos se ha observado que la mayoría de autores utiliza 18 h para la coincubación de ovocitos con espermatozoides (Del Campo y col., 1994; Mendoza y col., 2008; Huanca y col., 2009; Berland y col., 2010). Es así que en este estudio se optó por seguir utilizando las 18 h de incubación.

Luego del proceso de fecundación *in vitro*, los supuestos cigotos fueron pasados al medio Fluido Oviductal Sintético (SOF-IVC) suplementado con 3 mg/ml de BSA e incubados durante 7 días, para luego evaluar el desarrollo embrionario.

Hay varios parámetros para evaluar el desarrollo embrionario. Rose y Bavister (1992) proponen como criterio de evaluación del desarrollo embrionario, el estudio de la morfología y el progreso en el desarrollo; asimismo, relacionan estos parámetros con la cantidad de células que componen los embriones en estadios avanzados del desarrollo (mórulas y blastocistos).

Basado en este criterio, se ha determinado las 48 h post-inseminación para la obtención de embriones en segmentación (4 a 8 células), las 96 h para la obtención de embriones en mórula (16 a 64 células) y los 7 días para la obtención de embriones en blastocisto (más de 64 células). Todos estos estadios de desarrollo fueron evaluados para cada periodo de maduración *in vitro* (24, 28 y 32 h) de los ovocitos que fueron inseminados.

En este estudio el porcentaje de embriones divididos, del total de ovocitos inseminados fue de $41.55 \pm 3.65\%$, $47.54 \pm 2.91\%$ y $60.17 \pm 3.09\%$ de ovocitos madurados *in vitro* a 24, 28 y 32 h respectivamente (Tabla 06, Figura 15 y 17). Y el porcentaje de blastocisto, que se obtuvo del total de embriones divididos, fue de $11.03 \pm 2.08\%$, $14.19 \pm 1.70\%$ y $17.02 \pm 2.14\%$ de ovocitos madurados a 24, 28 y 32 h respectivamente (Figuran16 y 19).

Estos porcentajes superan ampliamente a los reportados por: Huanca y col. (2009) que utilizando tres tiempos para la maduración *in vitro* de los ovocitos, previo a la fertilización, obtuvieron una tasa de división del 9.5%, 7.7% y 15.4% ($p < 0,05$), para 30, 34 y 38 h respectivamente. Condori y col. (2010) utilizando 42 h para la maduración *in vitro* de ovocitos, obtuvieron una tasa de división y blastocisto del 39.1% y 13.6% respectivamente. Ochante R. (2010) obtuvo una tasa de división del 19.28%, 21.86%, 1.86% y 0.29% de ovocitos madurados a 24, 26, 48, 72 h respectivamente.

En otras investigaciones, Gamarra y col. (2008) utilizando 30 h de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca, e inseminándolos con espermias congelados/descongelados, obtuvieron 21.7% (71/262) de división a las 72 horas, 29% (21/71) de mórulas y blastocistos a los 5 días y 4.22% (3/71) de blastocistos eclosionados a los 7 días de incubación en medio SOF suplementado. Por otro lado, Mendoza y col., 2008, utilizando 25 h de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca y fertilizándolos con espermatozoides epididimarios recuperados por dos métodos (Gradiente de Percoll y Swim-up), obtuvieron 36.0% y 43.9% de segmentación, y 6.3% y 6.9% de blastocistos para Percoll y Swim-up respectivamente.

El análisis estadístico, muestra que los porcentajes de segmentados y blastocistos, difieren significativamente ($p < 0,05$) en los tres tiempos (24, 28 y 32 h) de maduración *in vitro*, pero no así, para los porcentajes de mórulas donde no existen diferencias significativas ($p > 0.05$). De todos estos resultados, concluimos que el tiempo de maduración *in vitro* requerido para que el ovocito adquiera la máxima capacidad de desarrollo embrionario es de 32 h de cultivo.

VI. CONCLUSIÓN

El tiempo óptimo para la maduración nuclear y la adquisición máxima de la capacidad de desarrollo embrionario *in vitro*, de ovocitos de alpaca, fue de 32 horas, bajo las condiciones del presente estudio.

VII. RECOMENDACIONES

- Antes de la preparación de los medio de cultivo deben revisarse cuidadosamente cada uno de los componentes, con el objetivo de descartar la presencia de contaminantes.
- En el proceso de preparación de medios de cultivo, debe tomarse en cuenta el valor del pH, pues un desequilibrio de éste involucraría un efecto negativo en el desarrollo celular y embrionario.
- Durante el proceso de maduración y fecundación *in vitro* los cuidados asépticos deben ser rigurosos para permitir un cultivo libre de microorganismos.
- Para trabajos posteriores se debe tomar en cuenta las características morfológicas y fisiológicas de la hembra (edad, raza, procedencia, etc).
- Se requiere de un mayor estudio de la progresión meiótica, ampliando los rangos de tiempo, para afirmar los resultados obtenidos en este estudio.
- Se debe continuar con estos trabajos de investigación, con el objetivo de permitir la estandarización de parámetros para el avance y aplicación de biotecnologías reproductivas en Camélidos Sudamericanos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abe, H. and Hoshi, H.** 1997. Bovine oviductal epithelial cells: Their cell culture and applications in studies for reproductive biology. *Cytotechnology*. Vol. 23, pp. 171-183.
2. **Adams, G.; Sumar, J. and Ginther, O.** 1991. Hemorrhagic ovarian follicles in llamas. *Theriogenology*. Vol. 35, pp. 557-568.
3. **Apa, R.; Lanzone, A.; Miceli, F.; Mastrandea, M.; Caruso, A.; Mancuso, S. and Canipari, R.** 1994. Growth hormone induces *in vitro* maturation of follicle- and cumulus- enclosed rat oocyte. *Mol Cell Endocrinol*. 106, pp. 207-212.
4. **Apaza, N.; Olarte, U. y Málaga, J.** 1998. Empadre controlado de alpacas Huacaya en el Banco de Germoplasma de la E.E. ILLPA Puno. Memorias de la XXI Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Universidad Nacional del Altiplano. Puno-Perú.
5. **Apaza, N.; Sapaná, R.; Huanca, T. y Huanca, W.** 2001. Inseminación Artificial en alpacas con semen fresco en comunidades campesinas. Memorias de la XIV Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú.
6. **Arlotto, T.; Leibfried-Rutledge, M. and First, N.** 1990. Size distribution and meiotic competence of bovine primary oocytes from two localities in the ovary. *Theriogenology* 33: 188.
7. **Armstrong, D.; Zhang, X.; Vanderhyden, B. and Khamsi, F.** 1991. Hormonal actions during oocyte maturation influence fertilization aid early

- unbryonic development. Anri. N. Y. Acad. Sci. 626: 137-158, 1991. N. Y. Acad. Sci. 626, pp. 137-158.
8. **Azambuja, R.; Kraemer, D. and Westhusin, M.** 1998. Effect of low temperatures on in vitro matured bovine oocytes. *Theriogenology*. Vol 49, pp. 1155-1164.
 9. **Bavister, B.** 1987. Studies on the developmental blocks in cultured hamster embryos. En: *The Mammalian Preimplantation Embryo: Regulation of Growth and Differentiation in vitro*. Plenum Press. N.Y. pp. 219-249.
 10. **Berland, M.; von Baer, A.; Parraguez, V.; Morales, P.; Adams, G.; Silva, M.; Ruiz, J. and Ratto, M.** 2010. In vitro fertilization and embryo development of cumulus oocyte complexes (COCs) collected by ultrasound guided follicular aspiration in llamas treated with gonadotropin. 36th Annual Conference of the IETS/23rd Annual Meeting SBTE. Córdoba –Argentina.
 11. **Bevers, M.; Dieleman, R.; van Den Hurk, R. and Izadyar, F.** 1997. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*. Vol. 47, pp. 13-22.
 12. **Blondin, P. and Sirard, M.** 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 41, pp. 54-62.
 13. **Boelhaue, M.; Sinowatz, F.; Wolf, E. and Paulalopes, F.** 2005. Maturation of Bovine Oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of *in vitro*-produced blastocysts. *Biol of Reprod.* 73, pp. 737-744.
 14. **Brackett, B.** 1981. Applications of in vitro fertilization. En *New Technologies in Animal Breeding*. Academic Press. pp. 141-159.
 15. **Brackett, B. and Zuelke, K.** 1993. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*. Vol. 39, pp. 43-64.
 16. **Brackett, B.; Younis, A. and Fayer-Hosken, R.** 1989. Enhanced viability after in vitro fertilization of bovine oocytes matured in vitro with high concentrations of luteinizing hormone. *Fertil. Steril.* Vol. 52, pp. 319-324.
 17. **Bravo, W.; Flores, U.; Garnica, J. and Ordoñez, C.** 1997. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology* 47: pp. 619-626.

18. **Brinster, R.** 1970. Culture of two-cell rabbit embryos to morulae. *J. Reprod. Fertil.* 21, pp. 17-22.
19. **Brucker, C.; Alexander, N.; Hodgen, G. and Sandow, B.** 1991. Transforming growth factor- α augments meiotic maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 28, pp. 94-98.
20. **Buccione, R.; Vanderhyden, B.; Caron, P. and Eppig, J.** 1990. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus *in vitro* is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Dev. Biol.* 138, pp. 16-25.
21. **Cárdenas, O.; Huanca, T.; Sapaná R. y Alarcón, V.** 1999. Avances de inseminación artificial de llamas con semen congelado. XXII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Huancavelica – Perú.
22. **Carolan, C.; Lonergan, P.; van Langendonck, A. and Mermillod P.** 1995. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Theriogenology*. Vol. 43, pp. 1115-1128.
23. **Chang, M.** 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168, pp. 697.
24. **Chaves, M.; Miragaya, M.; Capdevielle, E.; Rutter, B.; Giuliano, S. y Agüero, A.** 2003. Maduración *in vitro* de oocitos de vicuña obtenidos por aspiración quirúrgica de folículos de ovarios superestimulados. III Congreso de la Asociación Latinoamericana de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. ALEPRYCS. Viña del Mar – Chile.
25. **Conde, P.; Herrera, C.; Chaves, M.; Giuliano, S.; Director, A.; Trasorras, V.; Pinto, M.; Carchi, M.; Stivale, D.; Rutter, B.; Agüero, A.; Miragaya, M. and Pasqualini, R.** 2006. *In vitro* production of llama embryos by IVF or ICSI. *Reproduction, Fertility and Development* 19, pp. 237 -238.
26. **Conde, P.; Herrera, C.; Trasorras, V.; Giuliano, S.; Director, A.; Miragaya, M.; Chaves, M.; Carchi, M.; Stivale, D.; Quintans, C.; Agüero, A.; Rutter, B. and Pasqualini, S.** 2008. *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Animal Reproduction Science*. 109, pp. 298 - 308.

27. **Condori, R.; Huanca, W.; Chileno, M.; Cainzo, J.; Valverde, F.; Becerra, J.; Quintela, L.; and Herradon, P.** 2010. Effect of follicle-stimulating hormone addition on *in vitro* maturation and cleavage of alpaca (*Vicugna pacos*) embryos. *Reprod. Fert. And Dev.* 23 (1), pp. 224
28. **Conner, S.; Lefievre, L.; Hughe, D. and Barratt, C.** 2005. Cracking the egg: increased complexity in the zone pellucida. *Hum Reprod.* 20, pp. 1148 - 1152.
29. **Conti, M.; Andersen, C.; Richard, F.; Mehats, C.; Chun, S.; Horner, K.; Jin, C. and Tsafir, A.** 2002. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol.* 187, pp. 153 - 159.
30. **Cox, J.; Hormazábal, J. and Santa María, A.** 1993. Effect of the cumulus on *in vitro* fertilization of bovine matured oocytes. *Theriogenology.* Vol. 40, pp. 1259-1267.
31. **Cran, D.** 1989. Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 38, pp. 49 - 62.
32. **De Loos, F.; van Maurik, P.; van Beneden, T. and Kruip, T.** 1992. Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 31, pp. 208-214.
33. **Dekel, N. and Scherizly, L.** 1985. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle enclosed oocytes. *Endocrinology* 116, pp. 512 - 516.
34. **Del Campo, M.; Del Campo, C.; Adams, G. and Mapletoft, R.** 1995. The application of new reproductive technologies to South American Camelids. *Theriogenology* 43, pp. 21 - 30
35. **Del Campo, M.; Del Campo, C.; Donoso, M.; Berland, M. and Mapletoft, R.** 1994. *In vitro* fertilization and development of Llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology* 41, pp. 1219 - 1229.
36. **Del Campo, M.; Donoso, M. and Del Campo, C.** 1992. *In vitro* maturation of Llama (*Lama glama*) oocytes. *Proc 12th Int Cong Anim Reprod;* vol 1, pp. 324.
37. **Diaz, F.; Wigglesworth, K. and Eppig, J.** 2007. Oocytes are required for the preantral granulosa cell cumulus cell transition in mice. *Dev Biol.* 305, pp. 300.

38. **Donahue, R. and Stern, S.** 1968. Follicular cell support of oocyte maturation: Production of pyruvate *in vitro*. J. Reprod. Fert. Vol. 17, pp. 395 -404.
39. **Donnay, I.; Auquier, P.; Kaidi, S.; Carolan, C.; Lonergan, P.; Mermillod P. and Massip, A.** 1998. Vitrification of *in vitro* produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. Anim Reprod Sci. 52, pp. 93 - 104.
40. **Downs, S.** 1989. Specificity of epidemial growth factor action on maturation of the murine oocyte and the cumulus oophorus *in vitro*. Biol. Reprod. 41, pp. 371 - 379.
41. **Downs, S.; Daniel, S. and Eppio, L.** 1988. Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocyte by follicle stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. Exp. Zoal. 245, pp. 86 - 96.
42. **Ducibella, T.; Anderson, E.; Albertini, D.; Aalbero, J. and Rangarajan, S.** 1988. Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. Devl. Biol. 130, pp. 184 - 197.
43. **Eppig, J.; Freter, R.; Ward-Bailey, P. and Schultz, R.** 1983. Inhibition of oocyte maturation in the mouse: participation of cAMP, steroid hormones, and a putative maturation-inhibitor factor. Dev. Biol. Vol. 100, pp. 39 - 49.
44. **Eppig, J.; Schultz, R.; O'Brien, M. and Chesnel, F.** 1994. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. Dev. Biol. 164, pp. 1 - 9.
45. **Eyestone, W. and First N.** 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or conditioned medium. J. Reprod. Fert. Vol. 85, pp. 715-720.
46. **Fan, H. and Sun, Q.** 2004. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. Biol Reprod. 70, pp. 535-47.
47. **Farin, C. and Yang, L.** 1992. Inhibitbon of germinal vesicle breakdown by 5,6- dichlorobenzimidazole riboside in bovine oocytes matured *in vitro*. Theriogenology 37, pp. 208.

48. **Feng, P.; Catt, K. and Knetch, M.** 1988. Transforming growth factor- β stimulates meiotic maturation of the rat oocyte. *Endocrinology* 122, pp. 181-186.
49. **Fernández, H. y Esteban, T.** 2009. Efecto de diferentes niveles de glicerol y etilenglicol en el desarrollo de embriones partenogénéticos de alpacas. Tesis de Ingeniero Zootecnista. Escuela Académico Profesional de Zootecnia. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú.
50. **Fernández-Baca, S.** 1993. Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. *Animal Reproduction Science*. 33, pp. 307 - 323.
51. **First, N. and Parrish, J.** 1987. In vitro fertilization of ruminants. *J. Reprod. Fertil.* Vol. 34 (suppl), pp. 151-165.
52. **First, N. and Parrish, J.** 1988. Sperm maturation and *in vitro* fertilization. 11th International Congress on A.R. and A.1. Dublín, pp. 161 - 168.
53. **Fukui, Y.** 1990. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 26, pp. 40 - 46.
54. **Fukui, Y. and 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.
55. **Fukui, Y. and 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.* 22, pp. 66.
56. **Fukui, Y.; Fukushima, M.; Terawaki, Y. and Ono, H.** 1982. Effect of gonadotropin, steroids and culture media on bovine oocyte maturation. *Theriogenology*. Vol. 18, pp. 161 - 175.
57. **Fukui, Y.; McGowan, L.; James, R.; Pugh, P. and Tervit, H.** 1991. Factors affecting the in-vitro development to blastocyst of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fert.* Vol. 92, pp. 125-231.
58. **Gamarra, G.; Huamán, E.; León, M.; Carpio, S.; Alvarado, E.; Asparrin, M. and Vivanco, W.** 2008. First *in vitro* embryo production in alpacas (*Lama pacos*). *Reproduction, Fertility and Development* 21, 177-178.
59. **Gilula, N.; Epstein, M. and Beers, W.** 1978. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J cell Bioi.* 78, pp. 58 - 75.

60. **Gliedt, D.; Rosenkrans, C.; Rorie, R. and Rakes, J.** 1996a. Effects of oocyte maturation length, sperm capacitation time, and heparin on bovine embryo development. *Journal of Dairy Science*. Vol. 79(4), pp. 532-535.
61. **Gliedt, D.; Rosenkrans, C.; Rorie, R.; Munyon, A.; Pierson, J.; Miller, G. and Rakes, J.** 1996b. Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine embryo development *in vitro*. *Journal of Dairy Science*. Vol. 79(4), pp. 536-542.
62. **Gómez, C.; Ratto, M.; Berland, M.; Wolter, M. and Adams, G.** 2002. Superstimulatory response and oocyte collection in Alpacas. *Theriogenology* 57, pp. 584 (abstract).
63. **Gordon, I.** 1990, *In vitro* maturation (IVM) and fertilization (IVF) of cattle ova. *Embryo Transfer Newsletter* 8, pp. 6 - 11.
64. **Gougeon, A.** 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 17, pp. 121 - 155.
65. **Grimes, R. and Ireland, W.** 1986. Relationship of macroscopic appearance of the surface of bovine ovarian follicles, concentration of steroids in follicular fluid and maturation of oocytes *in vitro*. *Bioi. Rep.* Vol. 35, pp. 725 - 732.
66. **Hamano, S. and Kuwayama, M.** 1993. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*. Vol. 39, pp. 703-712.
67. **Harper, K. and Brackett, B.** 1992 a. Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Bioi. Repr.* Vol. 46, pp.256 - 260.
68. **Harper, K. and Brackett, B.** 1992 b. Enhanced bovine oocyte quality after *in vitro* maturation (IVM) with insulin-like growth factor-I (IGF-I) and gonadotropins. *Bioi. Reprod.* Vol. 46, pp.67.
69. **Henseleigh, H. and Hunter, A.** 1985. *In vitro* maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent *in vitro* fertilization and cleavage. *J Dairy Sci.* Vol.68, pp. 1456 - 1462.
70. **Hernandez-Ledezma, J.; Villanueva, C.; Sikes, J. and Kubisch, H.** 1996. Increasing the rate of blastocyst formation and hatching from *in vitro* produced bovine zygotes. *Theriogenology*. Vol. 46(6), pp. 961 - 969.

71. **Huanca, W.; Condori, R.; Cainzos, J.; Chileno, M.; Quintela, L.; Becerra J. and Herradon, P.** 2009. *In Vitro* Maturation and *In Vitro* Fertilization of Alpaca (*Vicugna Pacos*) Oocytes: Effect Of Time Of Incubation On Nuclear Maturation And Cleavage. *Reproduction, Fertility and Development* 22(1), pp. 327 – 327.
72. **Huanca, W.; Cordero, A.; Huanca, T. y Adams, G.** 2007. Biotecnologias reproductivas en Camelidos Sudamericanos domesticos: avances y perspectivas. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* Vol. 15.
73. **Hunter, H. and Greve, T.** 1997. Could artificial insemination of cattle be more fruitful Penalties associated with aging eggs. *Reprod. Dom. Anim.* 32, pp. 137 - 142.
74. **Hunter, M.** 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Rev Reprod.* 5, pp. 122 - 130.
75. **Hunter, R.** 1989. Aging of the unfertilised cow egg in vivo: how soon is fertility compromised. *Vet Rec;* 124, pp. 489 – 490.
76. **Hyttel, P.** 1987. Bovine cumulus-oocyte disconnection *in vitro*. *Anat. Embryol.* 176, pp. 41-44.
77. **Hyttel, P.** 1988. Oocyte maturation and fertilization in cattle. Ultrastructural aspects. Tesis doctoral. The Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen.
78. **Hyttel, P.; Xu, K.; Smith, S. and Greve, T.** 1986. Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in cattle. *J. Reprod. Fert.* Vol. 78, pp. 615-625.
79. **Iwazaki, S.; Kono, T.; Nakahara, T.; Shioya, T.; Pukushima, M. and Hanada, A.** 1987. New methods for recovery of oocytes from bovine ovarian tissue in relation to in vitro maturation and fertilization. *Jpn. J. Anim. Reprod.* Vol. 33, pp. 188-192.
80. **Jones K.** 2005. Mammalian egg activation: from Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Reproduction.* Dec;130(6):813 - 23
81. **Kalinowski, R.; Berlot, C.; Jones, T.; Ross, L. and Mehlmann, L.** 2004. Maintenance of meiotic prophase arrest in vertebrate oocytes by a Gs protein-mediated pathway. *Dev Biol.* 267, pp. 1 - 13.
82. **Katska, L. and Smorag, Z.** 1984. The influence of culture temperature on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 9, pp. 205 - 212.

83. **Katska, L. and Smorag, Z.** 1985. The influence of culture temperature on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* Vol. 9, pp. 205 - 212.
84. **Katska, L.; Rynska, B. and Smorag, Z.** 1995. The effect of co-culture system on developmental capacity of bovine IVM/IVF oocytes. *Theriogenology.* Vol. 43, pp. 859 - 870.
85. **Keskintepe, L. and Brackett, B.** 1996. *In vitro* developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol. Reprod.* Vol 55, pp. 333 - 339.
86. **Keskintepe, L.; Burnley, C. and Brackett, B.** 1995. Production of viable bovine blastocyst in defined *in vitro* conditions. *Biol. Reprod.* Vol. 52, pp. 1410-1417.
87. **Kikuchi, K.; Naito, K.; Daen, F.; Izaike, Y. and Toyoda, Y.** 1995. Histone H1 kinase activity during *in vitro* fertilization of pig follicular oocyte matured *in vitro*. *Theriogenology.* 43, pp. 523 - 532.
88. **Kim, J.; Niwa, K.; Lim, J. and Okuda, K.** 1993. Effects of phosphate, energysubstrate, and amino acids and development of *in vitro*-matured, *in vitro*-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol. Reprod.* Vol. 48, pp. 1320 - 1325.
89. **Kruip, T.; Cran, D.; van Beneden, T. and Dieleman, S.** 1983. Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. *Gamete Res.* 8, pp. 2947.
90. **Lee, E. and Fukui, Y.** 1995. Effect of various growth factors in a defined culture medium on *in vitro* development of bovine embryos matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology.* Vol. 44, pp.71-83.
91. **Lee, E.; Fujii, Y. and 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.
92. **Leibfried, M. and First, N.** 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *Anim. Sci.* 48, pp. 76 - 86.
93. **Leibfried, M. and First, N.** 1980. Effect of bovine and porcine follicular fluid and granulosa cells on maturation of oocytes *in vitro*. *Biol. Reprod.* 23, pp. 699 - 704.

94. **Leibfried-Rutledge, M.; Crister, E.; Parrish, J. and First, N.** 1989. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*. Vol. 31, pp. 61-74.
95. **Lenz, R.; Ball, G.; Leibfried, M.; Ax, R. and First, N.** 1983. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature dependent processes. *Biol. Reprod.* Vol. 29, pp.173 - 179.
96. **Liang, C.; Su, Y.; Fan, H.; Schatten, H. and Sun, Q.** 2007. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol.* 21, pp. 2037 - 2055.
97. **Ling, Z. and LU, K.** 1990. Frequency of cleavage and development of in vitro bovine oocytes fertilized in different numbers in drops with different sperm concentrations. *Theriogenology*. Vol. 33, pp. 275.
98. **Litscher, E. and Wassarman, P.** 2007. Egg extracellular coat proteins: from fish to mammals. *Histol Histopathol.* 22, pp. 337 - 347.
99. **Lonergan P., Sharip H., Monaghan P., Wahid H., Oallagher H., Gordon I.** 1992. Effect of follicle size on bovine oocyte morphology and embryo yield following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Theriogenology* 37: 248.
100. **Long, C.; Chase, C.; Balise, J.; Duby, R. and Robl, J.** 1993. Effect of sperm removal time, sperm concentration and motility enhancer on fertilization parameters and development of bovine embryos in vitro. *Theriogenology* 39, pp. 261, abstract.
101. **Long, C.; Damiani, P.; Pinto-Correia, C.; Maclean, R.; Duby, R. and Robl, J.** 1994. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured in vitro under various conditions of fertilization. *J Reprod Fertil.* 102, pp. 361 – 369.
102. **Lu, K.; Gordon, I.; Gallager, M. and McGovern, H.** 1987. Progeny established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *Vet. Rec.* Vol. 121, pp. 259 - 260.
103. **Machicado, R.; Delgado, P. y Flores, M.** 2009. Descripción del proceso de fertilización *in vitro* de ovocitos de llama (lama glama) obtenidos por superestimulación ovárica con eCG y fertilizados con semen tratado con proteasa. V Congreso Mundial sobre Camélidos. Riobamba, Ecuador.

104. **Marquant-Leguienne, B. and Humbolt, P.** 1998. Practical measures to improve in vitro blastocyst production in the bovine. *Theriogenology*. Vol. 43, pp. 3-11.
105. **Martínez-Díaz, M.; Gatica, R.; Correa, J. and Eyestone, W.** 2007. Gestaciones producidas con embriones bovinos clonados por transferencia nuclear. *Arch Med Vet* 39, pp. 59 - 62.
106. **Mehlmann, L.** 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*. 130, pp. 791 - 799.
107. **Mehlmann, L.; Jones, T. and Jaffe, L.** 2002. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science*. 297, pp. 1343-1345.
108. **Mendoza, J.; Ayuque, A.; Triviño, F.; Ayuque, G.; Landeo, L. y Ruiz, J.** 2008. Evaluación de dos métodos de recuperación de espermatozoides epididimarios para la fecundación in vitro de ovocitos de alpaca. Efecto de la exposición a etilenglicol sobre el desarrollo partenogenético in vitro de ovocitos de alpaca. XXXI Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Lima.
109. **Miragaya, M.; Chaves, M.; Capdevielle, E.; Ferrer, M.; Pinto, M.; Rutter, B.; Neild, D. and Agüero, A.** 2002. *In vitro* maturation of llama (*Lama glama*) oocytes obtained surgically using follicle aspiration. *Theriogenology* 57, pp. 731.
110. **Mochizuki, H.; Fukui, Y. and 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.
111. **Moor, R. and Gandolfi, E.** 1987. Molecular and cellular changes associated with maturation and early development of sheep eggs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 34, pp. 55 - 69.
112. **Moor, R.; Osborne, J.; Cran, D. and Walters, D.** 1981. Selective effect of gonadotrophins on cell coupling, nuclear maturation and protein synthesis in mammalian oocytes. *J. Embryol. Exp. Morphol.* Vol. 61, pp. 347.
113. **Motlik, J. and Fulka, J.** 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *theriogenology* 25, pp. 87 - 96.

114. **Mounsey, J.; Lu, K.; Patel, M.; Chen, Z.; Horne, L.; John, J.; Means, A.; Jones, L. and Moorman, J.** 1999. Modulation of *Xenopus* oocyte-expressed phospholemman-induced ion currents by co-expression of protein kinases. *Biochim Biophys Acta.* 1451, pp. 305 - 318.
115. **Nagao, Y.; Saeki, K.; Hoshi, M. and Nagai, M.** 1995. Early development of bovine embryos. *J. Reprod. Dev.* Vol. 41(5), pp. 129 - 136.
116. **Ochante, R.** 2010. Evaluación del tiempo de maduración de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones de *Lama pacos* "alpaca". Ayacucho 2009. Tesis para optar el título profesional de Bióloga. Universidad San Cristóbal de Huamanga – Ayacucho.
117. **Palasz, A.** 1996. Cultivo de embriones bovinos: recientes avances en el desarrollo de sistemas de cultivos definidos. Resúmenes II Simposio internacional de reproducción animal, Córdoba, Argentina. Vol. 1, pp. 185-194.
118. **Parrish, J.; Susko-Parrish, J.; Leibfried-Rutledge, M.; Critser, E.; Eyestone, W. and First, N.** 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25, pp. 591 - 600.
119. **Peters, J.** 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell.* 9, pp. 931 - 943.
120. **Phillips, P.** 1988. *In vitro* fertilization in cattle. College of Veterinary Medicine. Univ. of Missouri- Columbia. Vol. 1, pp. 1-19.
121. **Picton, M.; Harris, S.; Muruvi, W. and Chambers, E.** 2008. The *in vitro* growth and maturation of follicle. *Reproduction.* 136, pp. 703-715.
122. **Pinyopummintr, T. and Bavister, B.** 1995. Optimum gas atmosphere for *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology.* Vol. 44(4), pp. 471-477.
123. **Ramos, E.** 2009. Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de *Vicugna pacos* "Alpaca". Tesis de Maestría. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. Pp. 31 - 32
124. **Ratto, M.; Berland, M.; Huanca, W.; Singh, J. and Adams, G.** 2005. *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes. *Theriogenology* 63, pp. 2445 - 2457.
125. **Ratto, M.; Gómez, C.; Berland, M. and Adams, G.** 2007. Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Animal Reproduction Science* 97, pp. 246 - 256.

- 126. Ratto, M.; Wolter, M.; Gomez, C.; Berland, M. and Adams, G.** 1999. *In vitro* maturation of lama oocytes. Libro de resúmenes. *II Congreso Mundial sobre Camélidos*. Cuzco-Perú.
- 127. Rehman, N.; Collins, A.; Suh, T. and Wright, R.** 1994. Effect of sperm exposure time on *in vitro* fertilization and embryo development of bovine oocytes matured *in vitro*. *N Theriogenology* 41, pp. 1447 - 1452.
- 128. Richards, J.; Russell, D.; Ochsner, S. and Espey, L.** 2002. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu Rev Physiol.* 64, pp. 69-92.
- 129. Rose, T. and Bavister, B.** 1992. Effect of oocyte maturation medium on *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine embryos. *Mol. Reprod. Develop.* Vol. 31, pp. 72-77.
- 130. Ruiz, J and Correa, J.** 2007. Maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca y llama aspirados vía laparoscopia. I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica.
- 131. Ruiz, J.** 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.
- 132. Ruiz, J.; Ayuque, G.; Landeo, L.; Artica, M.; Ratto, M. y Correa J.** 2009. Activación Partenogenética de ovocitos vitrificados de alpaca. V Congreso Mundial sobre Camélidos. Riobamba, Ecuador.
- 133. Ruiz, J.; Correa, J.; Ayuque, G.; Landeo, L.; Yaranga, M. y Zacarías, A.** 2007. Producción *in vitro* de embriones partenogenéticos de alpaca y llama. I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú.
- 134. Ruiz, J.; Landeo, L.; Artica, M.; Ratto, M. y Correa, J.** 2011. Activación química de ovocitos de alpaca vitrificados después de la maduración *in vitro*. *Rev. investig. vet. Perú* v.22 n.3 Lima jul./sep.
- 135. Sacha, D. y Rojas, R.** 2009. Influencia de la categoría del ovocito en la producción de embriones partenogenéticos de alpaca (*Vicugna pacos*) en Huancavelica. Tesis de Ingeniero Zootecnista. Escuela Académico Profesional de Zootecnia. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú.

136. **Saeki, K.; Nao, Y.; Hoshi, M. and Nagai, M.** 1995. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on *in vitro* fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium. *Theriogenology*. Vol. 43, pp. 751 - 759.
137. **Saeki, K.; Nagao, Y.; Hoshi, M. and Kainuma, H.** 1994. Effects of cumulus cells on sperm penetration of bovine oocytes in protein-free medium. *Theriogenology*. Vol. 42, pp. 1115 - 1123.
138. **Sambussho, A. and Threlfall, W.** 1989. The effects of estrous cow serum on the *in vitro* maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. *Theriogenology*. Vol. 31, pp. 693 - 699.
139. **Sansinema, M.; Taylor, S.; Taylor, P.; Denniston, R. and Godke, R.** 2003. Production of Nuclear Transfer Llama (*Lama glama*) Embryos From *in vitro* matured llama oocytes. *Cloning Stem cells* 5, pp. 191 - 198.
140. **Sansinema, M.; Taylos, S.; Taylor, P.; Schmidt, E.; Denniston, R. and Godke, R.** 2007. *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Animal Reproduction Science* 99, pp. 342-353.
141. **Sato, E.; Iritani, A. and Nishikawa, Y.** 1977. Factors involving in maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured *in vitro*. *Jap. J. Anim. Reprod.* 23, pp. 12 - 18.
142. **Shea, B.; Latour, J.; Bedirian, K. and Baker, R.** 1976. Maturation *in vitro* and subsequent penetration of bovine follicular oocyte. *J. Anim. Sci.* Vol. 43, pp. 809 - 815.
143. **Shi, D.; Avery, B. and Greve, T.** 1998. Effects of temperature gradients on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*. Vol. 50, pp. 667 - 674.
144. **Sirard, M.** 1989. Practical aspects of *in vitro* fertilization in cattle. *J. Reprod. Fert.* 38, pp. 127-134.
145. **Stubbings, R.; Armstrong, D.; Beriault, R. and Basrur, P.** 1988. A method for aspirating bovine oocytes from small cesicular follicles: preliminary results. *Theriogenology*. Vol. 29, pp. 312.
146. **Su, Y.; Wu, X.; O'Brien, M.; Penndola, F.; Denegre, J.; Matzuk, M. and Eppig J.** 2004. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. *Dev Biol.* 276, pp. 64 - 73.

147. Sugie, T.; Seidel, G. and Hafez, E. 1980. Embryo-transfer. En: Reproduction in Farm Animals, editado por E.S.E. Hafez. Philadelphia: Lea y Febirger pp. 569 - 594.
148. Sumar, J. 1983. Studies on reproductive pathology in alpacas. MS Thesis, Department of Obstetrics and Gynaecology, College of Veterinary Medicine, Swedish University of Agriculture and Science, Uppsala. pp: 9-1003.
149. Sun, Q.; Miao, Y. and Schatten, H. 2009. Toward a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. Cell Cycle. 8, pp. 2741-7.
150. Swain, E. and Smith, G. 2007. Reversible phosphorylation and regulation of mammalian oocyte meiotic chromatin remodeling and segregation. Soc Reprod Fertil Suppl. 63, pp. 343 - 358.
151. Takahashi, Y.; Hishinuma, M.; Tanaka, H. and Kanagawa, H. 1996. Development of in vitro matured/fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: influence of oxygen concentration in the gas atmosphere. J. Vet. Med. Sci. Vol. 58, pp. 897 - 902.
152. Thibault, C.; Szollosi, D. and Gerard, M. 1987. Mammalian oocyte maturation. Reprod Nutr Dev. 27, pp. 865 - 896.
153. Tibary, A. and Anouassi, A. 1997. Theriogenology in camelidae. Abu Dhabi Printing, Mina, Abu Dhavi, UAE.
154. Tornell, J.; Billing, H. and Hillensjo, T. 1990. Resumption of rat oocyte meiosis is paralleled by a decrease in guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) and is inhibited by microinjection of Cgmp. Acta PhysiolScand. 139, pp.511 -517.
155. Van de Wiel, D.; Bar-Ami, S.; Tsafiriri, A. and De Jong, F. 1983. Oocyte maturation inhibitor, inhibin and steroid concentrations in porcine follicular fluid at various stages of the oestrous cycle. JReprod Fertil. 68, pp. 247 - 252.
156. Villamediana, P. 1998. Embriones caprinos producidos *in vitro*: estudio citogenético y ultraestructural de ovocitos madurados y fecundados *in vitro*. Universidad Autónoma de Barcelona. España. Tesis de grado.
157. Wassarman, P. and Litscher, E. 2008. Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida. Int J Dev Biol. 52, pp.665 - 676.

158. **Weimer, K.; Watson, A.; Polanski, V.; Mc Kenna, A.; Fick, G. and Schultz, G.** 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. and Dev.* Vol. 30, pp. 330-338.
159. **Whitten, W.** 1971. Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos *in vitro*. En: Schering Symposium on intrinsic and Extrinsic Factors in Early Mammalian Development, Advances in the Biosciences, editado por G. Raspé. Oxford: Pergamon Press, 1971, pp. 129-141.
160. **Wright, R. and Bondioli, K.** 1981. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. *J. Anim. Sci.* Vol. 53, pp. 702 - 729.
161. **Wurth, Y. and Kruij, T.** 1992. Bovine embryo production *in vitro* after selection of the follicles and oocytes. 12th International Congress on Animal Reproduction, pp. 387 - 389.
162. **Xiong, B.; Lin, S.; Li, M.; Xu, B.; OuYang, Y.; Hou, Y.; Chen, D. and Sun F.** 2008. Involvement of polo-like kinase 1 in MEK1/2-regulated spindle formation during mouse oocyte meiosis. *Cell Cycle.* 7, pp. 1804 - 1809.
163. **Xu, K. and Greve, T.** 1988. A detailed analysis of early events during *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.* 82: 127-134.
164. **Xu, P.; OReve, T.; Smith, S. and Hyttel, P.** 1986. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation *in vitro*. *Acta Vet. Scand.* 27, pp. 505-519.
165. **Yang, N.; Lu, K. and Gordon, I.** 1990. *In vitro* fertilization and culture of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology* 33, pp. 352.
166. **Yang, X.; Kubota, C.; Suzuki, H.; Taneja, M.; Bols, P. and Presicce, G.** 1998. Control of oocyte maturation in cows: biological factors. *Theriogenology.* Vol. 49, pp. 471 - 482.
167. **Younis, A.; Brackett, B. and Payrer-Hosken, R.** 1989. Influence of serum and hormone on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete. Res.* 23, pp. 189 - 201.
168. **Yu, L.; Xiong, B.; Gao, W.; Wang, C.; Zhong, S.; Huo, L.; Wang, Q.; Hou, Y.; Liu, K.; Liu, X.; Schatten, H.; Chen, D. and Sun, Q.** 2007. MEK1/2 regulates microtubule organization, spindle pole tethering and asymmetric division during mouse oocyte meiotic maturation. *Cell Cycle.* 6, pp. 330 - 338.

- 169. Zhang, L.; Jiang, S.; Wozniak, P.; Yang, X. and Godke, R. 1995.** Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and early embryo development in vitro. *Mol. Rep. Dev.* Vol. 40, pp. 338 - 344.
- 170. Zhang, M.; Ouyang, H.; Xia, G. 2009.** The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Mol Hum Reprod.* 15, pp. 399 - 409.
- 171. Zhang, M.; Xia, G.; Zhou, B. and Wang, C. 2007.** Gonadotropin-controlled mammal oocyte meiotic resumption. *Front Biosci.* 12, pp. 282 - 296.
- 172. Zuelke, K. and Brackett, B. 1992.** Effects of luteinizing hormone on glucose metabolism in cumulus-enclosed bovine oocytes matured in vitro. *Biol. Repr.* Vol. 46, pp. 267.

ANEXOS

ANEXO N° 1. MEDIOS UTILIZADOS PARA LA MADURACIÓN *in vitro* DE OVOCITOS

A) TCM-199 de trabajo o stock para IVM

Componentes	Cantidad/50 ml
TCM-199 polvo(M 5017)	0.75 g
NaHCO ₃	0.11 g
HEPES	0.298 g
Agua mili Q	completar hasta 50 ml

Duración un mes a 4° C.

B) Suplemento del medio de IVM

Componentes	Concentración	Volumen/10 ml
TCM-199 de trabajo	90%	9 ml
FCS	10%	1 ml
FSH ¹	0.02 unid./ml	10 µl (stock)
Piruvato de sodio ²	0.2 mM	20 µl (stock)
Gentamicina ³	50 µg/ml	10 µl (stock)
Estradiol 17-β ⁴	1 µg/ml	10 µl (stock)

Usar dentro del día de preparación

1. FSH stock: 20 A.U. FSH/1000 µl de suero fisiológico.

2. Piruvato de sodio stock: 11 mg ácido pirúvico/1000 µl de suero fisiológico.

3. Gentamicina stock: Sulfato de gentamicina 50 mg/1000 µl de suero fisiológico.

4. Estradiol stock: Estradiol 17-β 5 mg/5000 µl de etanol absoluto.

C) Insulina stock

Componentes	Cantidad/100 ml
Ácido acético	10 µl
Insulina	1 mg
Agua Mili Q	1 ml

ANEXO N° 2. MEDIOS UTILIZADOS PARA LA FECUNDACIÓN *in vitro* DE OVOCITOS

A) Medio SP-TALP (medio de lavado y capacitación de espermios)

Componente	Concentración	100 ml (mg)	µl stock sales
NaCl	100 mM	584.4 mg	2500 µl - 4 M
KCl	3.1 mM	23.1 mg	310 µl - 1 M
NaHCO ₃	25 mM	210 mg	--
NaH ₂ PO ₄	0.3 mM	3.6 mg	300 µl - 0,1 M
Lactato de Na	21.6 mM	368 ul	--
Ca Cl ₂ x 2H ₂ O	2 mM	29.4 mg	200 µl - 1 M
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0.4 mM	8.1 mg	399 µl - 0,1 M
HEPES	10 mM	238 mg	--
Rojo Fenol	(1%) 100 µl; (0.5%) 200 µl		--

Titular pH = 7,4, Mantener refrigerado (15 a 30 días)

B) Suplemento de medio SP-TALP

SUPLEMENTO : Para 10 ml de Medio (agregar antes de filtrar para usar)	
Piruvato Na 1.0 mM	10 μ l
Gentamicina 50 μg/ml stock	10 μ l
BSA F V (A-8022)	6 mg/ml

Filtrar 0,22 μ m
Incubar al menos 2 horas antes de usar

C) Medio TALP-HEPES (Medio de lavado de ovocitos)

Componente (mM)	Concentración	100 ml (mg)	μ l stock sales
NaCl	114 mM	666 mg	2849 μ l - 4 M
KCl	3.2mM	23.8 mg	319 μ l - 1 M
NaHCO₃	2 mM	16.8 mg	--
NaH₂PO₄	0.4 mM	4.8 mg	400 μ l - 0,1 M
Lactato de Na	10 mM	187 μ l	--
Ca Cl₂ x 2H₂O	2 mM	29.4 mg	200 μ l - 1 M
Mg Cl₂ x 6H₂O	0.5 mM	10 mg	492 μ l - 0,1 M
HEPES	10 mM	238 mg	--
Rojo Fenol	--	(1%) 100 μ l; (0,5%) 200 μ l	

Titular pH = 7,4, Mantener refrigerado (15 a 30 días)

D) Suplemento para TALP-HEPES

SUPLEMENTO: Para 10 ml de medio (agregar antes de filtrar para usar)	
Piruvato Na 0.2 mM	10 μ l
Gentamicina 50 μg/ml stock	10 μ l
BSA F V (A-8022)	30 mg

Filtrar 0.22 μ m
Temperar antes de usar

E) Medio FERT-TALP (Medio de fecundación)

Componente (mM)	Concentración	100 ml (mg)	μ l stock sales
NaCl	114 mM	666 mg	2849 μ l - 4 M
KCl	3.2mM	23.8 mg	319 μ l - 1 M
NaHCO₃	25mM	210 mg	--
NaH₂PO₄	0.4 mM	4.8mg	400 μ l - 0,1 M
Lactato de Na	10 mM	187 μ l	--
Ca Cl₂ x 2H₂O	2 mM	29.4 mg	200 μ l - 1 M
Mg Cl₂ x 6H₂O	0.5mM	10 mg	492 μ l - 0,1 M
HEPES	--	238 mg	--
Rojo Fenol	--	(1%) 100 μ l; (0,5%) 200 μ l	

Titular pH = 7,4, Mantener refrigerado (15 a 30 días)

F) Suplemento para FERT-TALP

SUPLEMENTO: Para 10 ml de medio (agregar antes de filtrar para usar)		
Piruvato Na	0.2 mM	10 μ l
Gentamicina	50 μ g/ml stock	10 μ l
BSA Sigma (A-6003)		6 mg/ml
Filtrar 0.22 μ m		
Temperar antes de usar		
Al inseminar agregar heparina		

G) Medio SP-TALP para recuperación de espermatozoides

SP-TALP 10x (Medio utilizado para preparar gradiente de Percoll)		
Componente	25 ml (mg)	μ l stock sales
NaCl	6250 μ l	4 M
KCl	57.75 mg	775 μ l - 1 M
NaH₂PO₄	9 mg	750 μ l - 0,1 M
Ca Cl₂ x 2H₂O	73.5 mg	500 μ l - 1 M
Mg Cl₂ x 6H₂O	20.25 mg	998 μ l - 0,1 M
HEPES	595 mg	---

Mantener refrigerado (1 a 2 meses)

H) Stock A

Componentes	Concentración	Cantidad/100 ml	Cantidad/50 mi
NaCl	107.7 mM	6.294 g	3.147 g
KCl	7.16 mM	0.534 g	0.267 g
NaH₂PO₄ (2H₂O)	1.19 mM	0.162 g	0.081 g
CaCl₂ (2H₂O)	1.71 mM	0.2514 g	0.1257
MgCl₂ (2H₂O)	0.49 mM	0.0996 g	0.0498 g
Rojo fenol (0,5%)	--	100 μ l	50 μ l
Agua mill Q	--	Completar hasta 100 ml	completar hasta 50ml

Duración un mes a 4° C

I) Stock B

Componentes	Concentración	Cantidad/100 ml	Cantidad/50ml
NaHCO ₃	37 mM	1.3 g	0.65 g
Rojo fenol (0,5%)	--	100 µl	50 µl
Agua mili Q		Completar hasta 100 ml	Completar hasta 50 ml

Duración un mes a 4° C

J) Fluido Sintético del Oviducto Modificado, mSOF

Componentes	Concentración	Volumen /100 ml	Volumen /50 ml
Stock A	--	10.0 ml	5.0 ml
Stock B	--	16.2 ml	8.1 ml
Piruvato de Sodio	0.33 mM	3.6 mg	1.8 mg
L-glutamina	1 mM	14.6 mg	7.3 mg
Glucosa	1 mM	18 mg	9.0 mg
Glicina	5 mM	37.5 mg	18.75 mg
Taurina	5 mM	62.5 mg	31.25 mg
Lactato de sodio 60% ¹	3.3 mM	47 µl (stock)	23 µl (stock)
BME ²	50 x	2 ml	1 ml
MEM ³	100 x	1 ml	0,5 ml
Insulina ⁴	10 µg/ml	100 µl (stock)	50 µl (stock)
Sulfato de gentamicina ⁵	50 µg/ml	100 µl (stock)	50 µl (stock)
Agua mili Q		Completar hasta 100 ml	completar hasta 50 ml
BSA Sigma A-6003	3 mg/ml	---	---

Duración una semana a 4 ° C

1. Lactato de Sodio stock: 600 µl lactato de sodio/400 µl de agua Mili Q.

2. BME: 12 aminoácidos esenciales para medio base Tagle.

3. MEM: 7 aminoácidos no esenciales para medio esencial mínimo.

4. Insulina stock: insulina 1 mg/10 µl ácido acético/1000 µl de agua Mili Q.

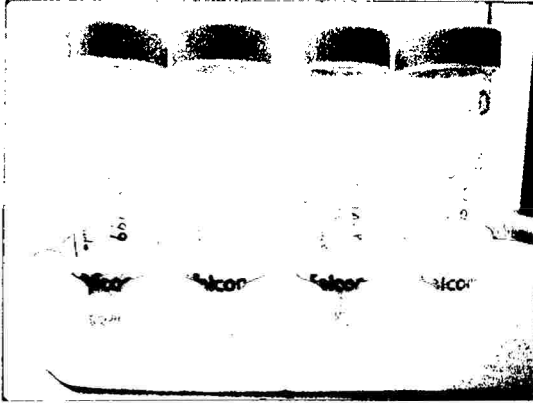
5. Gentamicina stock: Sulfato de gentamicina 50 mg/1000 µl de suero fisiológico.

K) Solución de Hialuronidasa

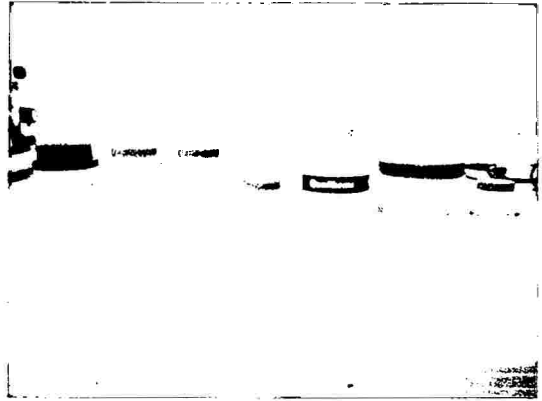
Componentes	Cantidad/10ml
PBS (-) 10x o Sof Hepes	1 ml
Agua mili Q	9 ml
Hialuronidasa	10 mg

Almacenar a -20°C alícuotas de 0.5ml

ANEXO Nº 3. MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO



Fotografía 1. Medios de cultivo (TCM-199, Fert-TALP, Sperm-TALP y SOF-IVC).



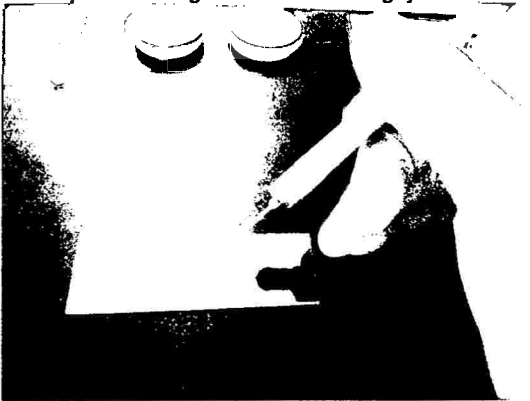
Fotografía 2. Componentes de los medios de cultivo (sales y stock de trabajo).



Fotografía 3. Aspiración folicular de ovarios de alpaca. Jeringa de 10 ml con aguja 21G



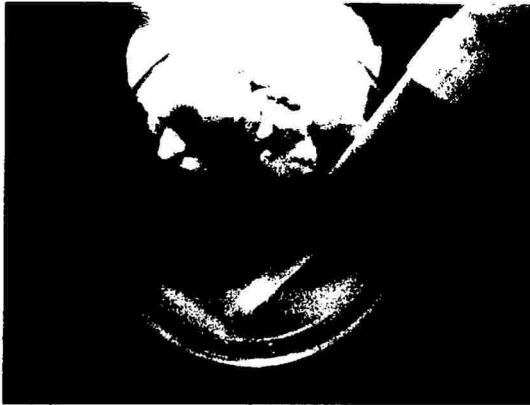
Fotografía 4. Placa de Petri con microgotas de medio TCM-199 cubiertas con aceite mineral.



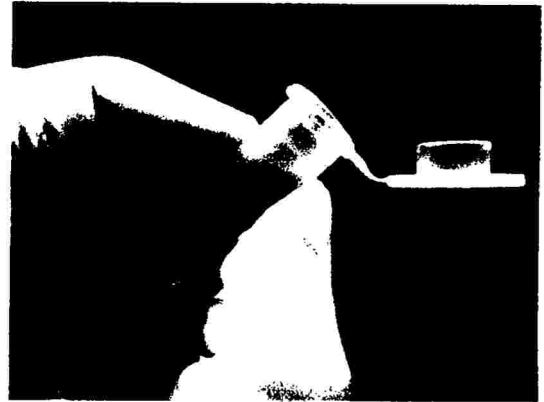
Fotografía 5. Montaje de ovocitos en el portaobjetos (vaselina, estilete, cubreobjetos).



Fotografía 6. Coloración de ovocitos con orceína acética al 1%



Fotografía 7. Recuperación de espermatozoides



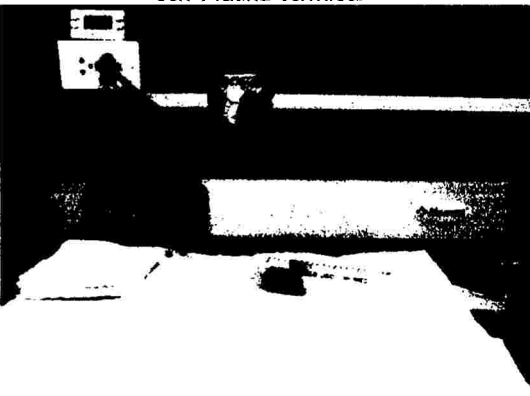
Fotografía 8. Técnica de Swim-up.



Fotografía 9. Estereoscopo Lavomet CSM2 con Plátina térmica.



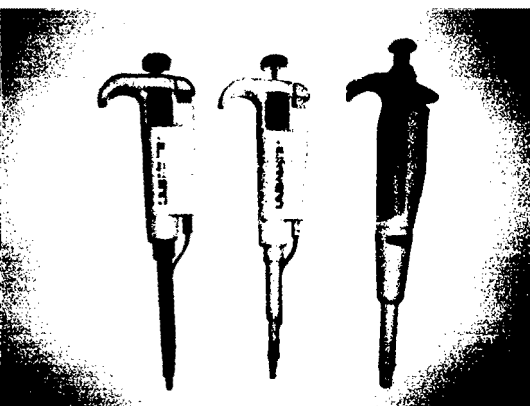
Fotografía 10. Microscopio invertido trinocular Novel Ningbo XDS-403AT.



Fotografía 11. Plátina térmica Neovet.



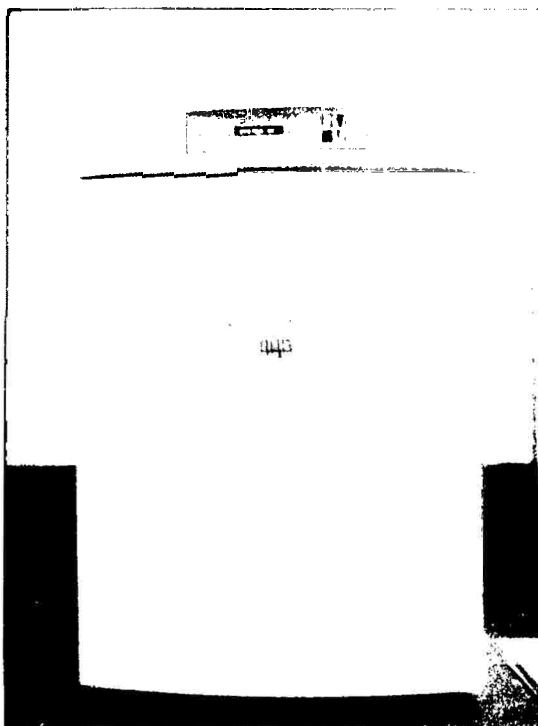
Fotografía 12. Refrigeradora con los medios de cultivo, hormonas y soluciones de trabajo.



Fotografía 13. Micropipetas de 10, 100 y 1000µl



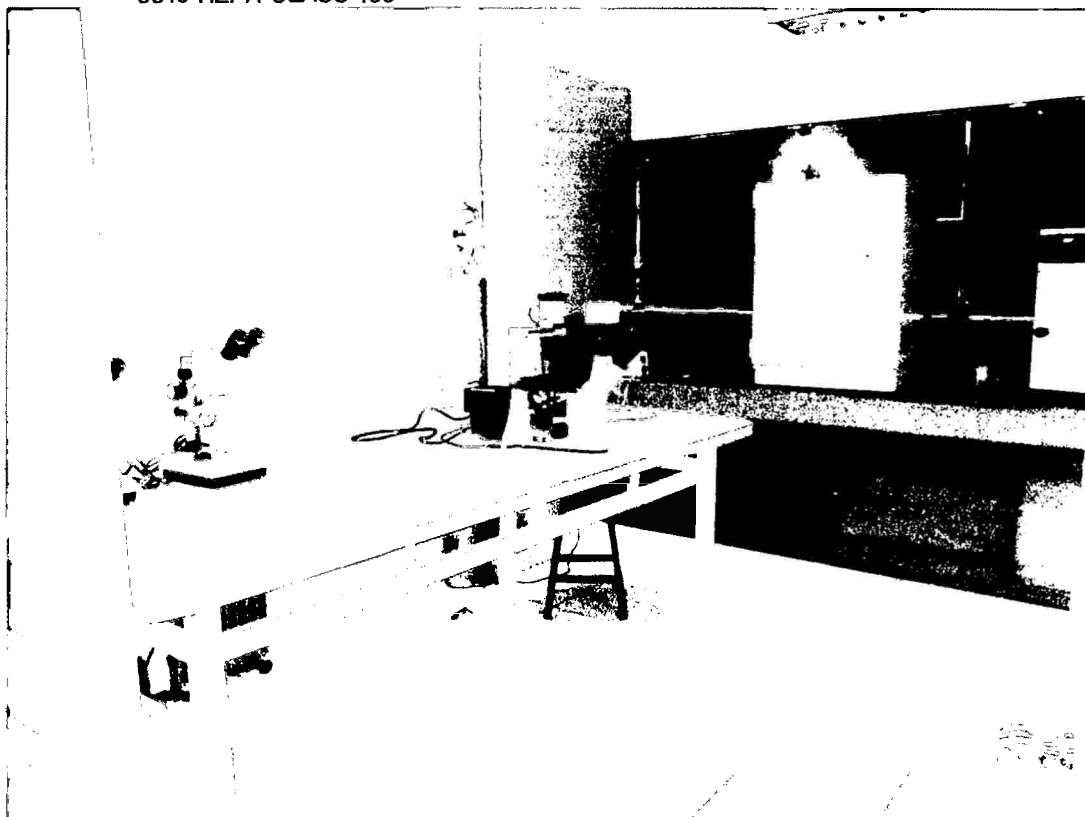
Fotografía 14. Estufa Cimatic



Fotografía 13. Incubadora de CO₂ THERMO 3310 HEPA CLASS 100



Fotografía 11. Camara de Flujo laminar ESCO.



Fotografía 15. Sala de cultivo celular y fecundación *in vitro*

ANEXO 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PORCENTAJE DE OVOCITOS DE ALPACA EN ESTADÍO DE VESÍCULA GERMINAL (VG)

Cuadro 4.1. Información de nivel de clase

Clase	Nivel	Valores
Repeticiones	10	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Tratamientos	3	A B C
Número de observaciones leídas	30	
Número de observaciones usadas	30	

Cuadro 4.2. Análisis de varianza

Variable Dependiente: Vesícula Germinal

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	0.00094850	0.00047425	0.03	0.9733
Error	27	0.47202815	0.01748252		
Total corregido	29	0.47297665			

Cuadro 4.3. Coeficiente de determinación, coeficiente de variación, raíz MSE y media de la variable

R-cuadrado	Coeficiente de Variación	Raíz MSE	Media: Estadio de maduración en Vesícula Germinal
0.002005	103.3822	0.132221	0.127896

Cuadro 4.4. Test de rango múltiple de Duncan

Nota: Este test controla el tipo y el índice de error de las comparaciones, no el índice de error experimental.	
Alpha	0.05
Grados de libertad del error	27
Cuadro medio del error	0.017483

Cuadro 4.5. Rangos críticos y número de medias

Nota: Los tamaños de las celdas no son igual		
Número de medias	2	3
Rango crítico	.1213	.1275

Cuadro 4.6. Comparación de medias a través de la prueba de Duncan

Horas de Maduración	Nº de observaciones	MEDIA	AGRUPAMIENTO DUNCAN
24 horas	10	0.12932	A
28 horas	10	0.12041	A
32 horas	10	0.13396	A

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

Cuadro 4.7. Transformación arco seno (arcsen) de los porcentajes

Observ.	Horas de maduración	Repet.	%VG	Arcsen %
1	24 h	1	0.00	0.00000
2	24 h	2	5.56	0.23804
3	24 h	3	0.00	0.00000
4	24 h	4	6.67	0.26122
5	24 h	5	0.00	0.00000
6	24 h	6	0.00	0.00000
7	24 h	7	5.00	0.22551
8	24 h	8	5.41	0.23474
9	24 h	9	2.89	0.17083
10	24 h	10	2.63	0.16289
11	28 h	1	7.14	0.27049
12	28 h	2	6.90	0.26580
13	28 h	3	0.00	0.00000
14	28 h	4	0.00	0.00000
15	28 h	5	4.55	0.21496
16	28 h	6	0.00	0.00000
17	28 h	7	0.00	0.00000
18	28 h	8	5.88	0.24493
19	28 h	9	4.26	0.20789
20	28 h	10	0.00	0.00000
21	32 h	1	4.35	0.21011
22	32 h	2	0.00	0.00000
23	32 h	3	9.09	0.30626
24	32 h	4	5.56	0.23804
25	32 h	5	3.85	0.19750
26	32 h	6	0.00	0.00000
27	32 h	7	14.29	0.387666
28	32 h	8	0.00	0.00000
29	32 h	9	0.00	0.00000
30	32 h	10	0.00	0.00000

ANEXO 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PORCENTAJE DE OVOCITOS DE ALPACA EN ESTADIO DE VESÍCULA GERMINAL ROTA (VGDB)

Cuadro 5.1. Información de nivel de clase

Clase	Nivel	Valores
Repeticiones	10	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Tratamientos	3	A B C
Número de observaciones leídas	30	
Número de observaciones usadas	30	

Cuadro 5.2. Análisis de varianza

Variable Dependiente: Vesícula Germinal Rota

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	0.00364040	0.00182020	0.14	0.8683
Error	27	0.34612227	0.01281934		
Total corregido	29	0.34976267			

Cuadro 5.3. Coeficiente de determinación, coeficiente de variación, raíz MSE y media de la variable

R-cuadrado	Coeficiente de Variación	Raíz MSE	Media: Estadio de maduración en Vesícula Germinal
0.010408	133.1618	0.113223	0.085026

Cuadro 5.4. Test de rango múltiple de Duncan

Nota: Este test controla el tipo y el índice de error de las comparaciones, no el índice de error experimental.	
Alpha	0.05
Grados de libertad del error	27
Cuadro medio del error	0.012819

Cuadro 5.5. Rangos críticos y número de medias

Nota: Los tamaños de las celdas no son igual		
Número de medias	2	3
Rango crítico	.1039	.1092

Cuadro 5.6. Comparación de medias a través de la prueba de Duncan

Horas de Maduración	Nº de observaciones	MEDIA	AGRUPAMIENTO DUNCAN
24 horas	10	0.07234	A
28 horas	10	0.09920	A
32 horas	10	0.08354	A

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

Cuadro 5.7. Transformación arco seno (arcsen) de los porcentajes

Observ.	Horas de maduración	Repet.	%VG	Arcsen %
1	24 h	1	0.00	0.00000
2	24 h	2	0.00	0.00000
3	24 h	3	0.00	0.00000
4	24 h	4	0.00	0.00000
5	24 h	5	0.00	0.00000
6	24 h	6	0.00	0.00000
7	24 h	7	5.00	0.22551
8	24 h	8	2.70	0.16507
9	24 h	9	2.86	0.16993
10	24 h	10	2.63	0.16289
11	28 h	1	0.00	0.00000
12	28 h	2	0.00	0.00000
13	28 h	3	10.00	0.32175
14	28 h	4	0.00	0.00000
15	28 h	5	0.00	0.00000
16	28 h	6	6.67	0.26122
17	28 h	7	5.00	0.22551
18	28 h	8	0.00	0.00000
19	28 h	9	0.00	0.00000
20	28 h	10	3.33	0.18351
21	32 h	1	0.00	0.00000
22	32 h	2	0.00	0.00000
23	32 h	3	6.06	0.24873
24	32 h	4	0.00	0.00000
25	32 h	5	3.85	0.19750
26	32 h	6	4.17	0.20565
27	32 h	7	0.00	0.00000
28	32 h	8	3.33	0.18351
29	32 h	9	0.00	0.00000
30	32 h	10	0.00	0.00000

ANEXO 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PORCENTAJE DE OVOCITOS DE ALPACA EN ESTADÍO DE METAFASE I (M-I)

Cuadro 6.1. Información de nivel de clase

Clase	Nivel	Valores
Repeticiones	10	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Tratamientos	3	A B C
Número de observaciones leídas	30	
Número de observaciones usadas	30	

Cuadro 6.2. Análisis de varianza

Variable Dependiente: Metafase I

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	0.24036301	0.12018150	8.92	0.0011
Error	27	0.36380474	0.01347425		
Total corregido	29	0.60416774			

Cuadro 6.3. Coeficiente de determinación, coeficiente de variación, raíz MSE y media de la variable

R-cuadrado	Coeficiente de Variación	Raíz MSE	Media: Estadio de maduración en Vesícula Germinal
0.397842	18.99590	0.116079	0.611072

Cuadro 6.4. Test de rango múltiple de Duncan

Nota: Este test controla el tipo y el índice de error de las comparaciones, no el índice de error experimental.	
Alpha	0.05
Grados de libertad del error	27
Cuadro medio del error	0.013474

Cuadro 6.5. Rangos críticos y número de medias

Nota: Los tamaños de las celdas no son igual		
Número de medias	2	3
Rango crítico	.1065	.1119

Cuadro 6.6. Comparación de medias a través de la prueba de Duncan

Horas de Maduración	Nº de observaciones	MEDIA	AGRUPAMIENTO DUNCAN
24 horas	10	0.68582	A
28 horas	10	0.66218	A
32 horas	10	0.48522	B

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

Cuadro 6.7. Transformación arco seno (arcsen) de los porcentajes

Observ.	Horas de maduración	Repet.	% VG	Arcsen %
1	24 h	1	50.00	0.78540
2	24 h	2	44.44	0.72968
3	24 h	3	10.00	0.32175
4	24 h	4	40.00	0.68472
5	24 h	5	50.00	0.78540
6	24 h	6	50.00	0.78540
7	24 h	7	40.00	0.68472
8	24 h	8	40.54	0.69022
9	24 h	9	40.00	0.68472
10	24 h	10	42.11	0.70617
11	28 h	1	35.71	0.64048
12	28 h	2	31.03	0.59082
13	28 h	3	30.00	0.57964
14	28 h	4	63.64	0.92355
15	28 h	5	31.82	0.59933
16	28 h	6	40.00	0.68472
17	28 h	7	35.00	0.63305
18	28 h	8	41.18	0.68673
19	28 h	9	34.04	0.62296
20	28 h	10	36.67	0.65047
21	32 h	1	26.09	0.53610
22	32 h	2	25.00	0.52360
23	32 h	3	6.06	0.24873
24	32 h	4	27.78	0.55515
25	32 h	5	15.38	0.40299
26	32 h	6	16.67	0.42058
27	32 h	7	35.71	0.64048
28	32 h	8	20.00	0.46365
29	32 h	9	21.05	0.47665
30	32 h	10	30.43	0.58432

ANEXO 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PORCENTAJE DE OVOCITOS DE ALPACA EN ESTADIO DE METAFASE II (M-II)

Cuadro 7.1. Información de nivel de clase

Clase	Nivel	Valores
Repeticiones	10	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Tratamientos	3	A B C
Número de observaciones leídas		30
Número de observaciones usadas		30

Cuadro 7.2. Análisis de varianza

Variable Dependiente: Metafase II

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F- Valor	Pr > F
Modelo	2	0.20368922	0.10184461	13.80	<.0001
Error	27	0.19929396	0.00738126		
Total corregido	29	0.40298318			

Cuadro 7.3. Coeficiente de determinación, coeficiente de variación, raíz MSE y media de la variable

R-cuadrado	Coeficiente de Variación	Raíz MSE	Media: Estadio de maduración en Vesícula Germinal
0.505453	10.40188	0.085914	0.825949

Cuadro 7.4. Test de rango múltiple de Duncan

Nota: Este test controla el tipo y el índice de error de las comparaciones, no el índice de error experimental.	
Alpha	0.05
Grados de libertad del error	27
Cuadro medio del error	0.007381

Cuadro 7.5. Rangos críticos y número de medias

Nota: Los tamaños de las celdas no son igual		
Número de medias	2	3
Rango crítico	.07884	.08283

Cuadro 7.6. Comparación de medias a través de la prueba de Duncan

Horas de Maduración	Nº de observaciones	MEDIA	AGRUPAMIENTO DUNCAN
24 horas	10	0.74909	A
28 horas	10	0.78853	A
32 horas	10	0.94023	B

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

Cuadro 7.7. Transformación arco seno (arcsen) de los porcentajes

Observ.	Horas de maduración	Repet.	%VG	Arcsen %
1	24 h	1	44.44	0.72968
2	24 h	2	44.44	0.72968
3	24 h	3	70.00	0.99116
4	24 h	4	46.67	0.75207
5	24 h	5	48.86	0.71375
6	24 h	6	41.67	0.70171
7	24 h	7	45.00	0.73531
8	24 h	8	43.24	0.71759
9	24 h	9	48.86	0.71375
10	24 h	10	42.11	0.70617
11	28 h	1	50.00	0.78540
12	28 h	2	51.72	0.80260
13	28 h	3	50.00	0.78540
14	28 h	4	36.36	0.80260
15	28 h	5	54.55	0.78540
16	28 h	6	53.33	0.64725
17	28 h	7	50.00	0.83096
18	28 h	8	52.94	0.81872
19	28 h	9	51.06	0.78540
20	28 h	10	53.33	0.81482
21	32 h	1	69.57	0.98647
22	32 h	2	66.67	0.95535
23	32 h	3	69.70	0.98789
24	32 h	4	61.11	0.89743
25	32 h	5	69.23	0.98279
26	32 h	6	70.83	1.00025
27	32 h	7	35.71	0.64048
28	32 h	8	70.00	0.99116
29	32 h	9	68.42	0.97404
30	32 h	10	69.57	0.98647

ANEXO 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PORCENTAJE DE SEGMENTACIÓN

Cuadro 8.1. Análisis de varianza

Variable Dependiente: Segmentación

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	0.20182002	0.10091001	116.48	<.0001
Error	30	0.02598966	0.00086632		
Total corregido	32	0.22780968			

Cuadro 8.2. Coeficiente de determinación, coeficiente de variación, raíz MSE y media de la variable

R-cuadrado	Coeficiente de Variación	Raíz MSE	Media: Estadio de maduración en Vesícula Germinal
0.885915	3.758806	0.029433	0.783050

Cuadro 8.3. Test de rango múltiple de Duncan

Nota: Este test controla el tipo y el índice de error de las comparaciones, no el índice de error experimental.	
Alpha	0.05
Grados de libertad del error	30
Cuadro medio del error	0.000866

Cuadro 8.4. Rangos críticos y número de medias

Nota: Los tamaños de las celdas no son igual		
Número de medias	2	3
Rango crítico	.02563	.02694

Cuadro 8.5. Comparación de medias a través de la prueba de Duncan

Horas de Maduración	Nº de observaciones	MEDIA	AGRUPAMIENTO DUNCAN
24 horas	10	0.70037	A
28 horas	10	0.76078	B
32 horas	10	0.88800	C

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

ANEXO 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PORCENTAJE DE MÓRULAS.

Cuadro 9.1. Análisis de varianza

Variab le Dependiente: Mórula

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	0.00542086	0.00271043	0.45	0.6417
Error	30	0.18056955	0.00601898		
Total corregido	32	0.18599041			

Cuadro 9.2. Coeficiente de determinación, coeficiente de variación, raíz MSE y media de la variable

R-cuadrado	Coeficiente de Variación	Raíz MSE	Media: Estadio de maduración en Vesícula Germinal
0.029146	7.847471	0.077582	0.988626

Cuadro 9.3. Test de rango múltiple de Duncan

Nota: Este test controla el tipo y el índice de error de las comparaciones, no el índice de error experimental.	
Alpha	0.05
Grados de libertad del error	30
Cuadro medio del error	0.006019

Cuadro 9.4. Rangos críticos y número de medias

Nota: Los tamaños de las celdas no son igual		
Número de medias	2	3
Rango crítico	.06756	.07100

Cuadro 9.5. Comparación de medias a través de la prueba de Duncan

Horas de Maduración	Nº de observaciones	MEDIA	AGRUPAMIENTO DUNCAN
24 horas	10	0.97334	A
28 horas	10	1.00470	A
32 horas	10	0.98783	A

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

ANEXO 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PORCENTAJE DE BLASTOCISTOS

Cuadro 10.1. Análisis de varianza

Variable Dependiente: Blastocisto					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	0.04219906	0.02109953	23.67	<.0001
Error	30	0.02674702	0.00089157		
Total corregido	32	0.06894608			

Cuadro 10.2. Coeficiente de determinación, coeficiente de variación, raíz MSE y media de la variable

R-cuadrado	Coeficiente de Variación	Raíz MSE	Media: Estadio de maduración en Vesícula Germinal
0.612059	7.806376	0.029859	0.382487

Cuadro 10.3. Test de rango múltiple de Duncan

Nota: Este test controla el tipo y el índice de error de las comparaciones, no el índice de error experimental.	
Alpha	0.05
Grados de libertad del error	30
Cuadro medio del error	0.000892

Cuadro 10.4. Rangos críticos y número de medias

Nota: Los tamaños de las celdas no son igual		
Número de medias	2	3
Rango crítico	.02600	.02733

Cuadro 10.5. Comparación de medias a través de la prueba de Duncan

Horas de Maduración	Nº de observaciones	MEDIA	AGRUPAMIENTO DUNCAN
24 horas	10	0.33718	A
28 horas	10	0.38571	B
32 horas	10	0.42460	C

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

Cuadro 10.6. Transformación arco seno (arcsen) de los datos

Ob.	Trat.	Rept.	Div.	Mór.	Blast.	Arcsen (División)	Arcsen (Mórula)	Arcsen (Blastocisto)
1	24 h	1	42.50	64.71	11.76	0.71011	0.93471	0.35003
2	24 h	2	42.22	73.68	10.53	0.70728	1.03209	0.33048
3	24 h	3	45.71	75.00	12.50	0.74245	1.04720	0.36137
4	24 h	4	41.46	58.82	11.76	0.69958	0.87406	0.35003
5	24 h	5	43.24	62.50	12.50	0.71759	0.91174	0.36137
6	24 h	6	45.00	66.67	11.11	0.73531	0.95535	0.33982
7	24 h	7	41.67	73.33	13.33	0.70171	1.02812	0.37374
8	24 h	8	38.89	64.29	7.14	0.67336	0.93032	0.27049
9	24 h	9	40.00	72.22	11.11	0.68472	1.01565	0.33982
10	24 h	10	36.36	75.00	12.50	0.64725	1.04720	0.36137
11	24 h	11	40.00	64.29	7.14	0.68472	0.93032	0.17049
12	28 h	1	46.34	68.42	15.79	0.74877	0.97404	0.40865
13	28 h	2	50.00	61.90	14.29	0.78540	0.90555	0.38766
14	28 h	3	50.00	76.19	14.29	0.78540	1.06105	0.38766
15	28 h	4	48.78	70.00	15.00	0.77320	0.99116	0.39770
16	28 h	5	48.57	76.47	11.76	0.77110	1.06434	0.35003
17	28 h	6	50.00	70.00	15.00	0.78540	0.99116	0.39770
18	28 h	7	50.00	74.07	14.81	0.78540	1.03652	0.39503
19	28 h	8	45.45	65.00	15.00	0.73984	0.93774	0.39770
20	28 h	9	47.22	70.59	11.76	0.75758	0.99761	0.35003
21	28 h	10	46.15	66.67	16.67	0.74686	0.95535	0.42058
22	28 h	11	40.48	82.35	11.76	0.68961	1.13722	0.35003
23	32 h	1	57.69	80.00	13.33	0.86260	1.10715	0.37374
24	32 h	2	61.29	78.95	15.79	0.89928	1.09415	0.40865
25	32 h	3	56.67	71.43	19.05	0.85230	1.00687	0.45166
26	32 h	4	56.00	71.43	14.29	0.84554	1.00687	0.38766
27	32 h	5	60.98	76.00	16.00	0.89610	1.05882	0.41152
28	32 h	6	50.98	72.73	18.18	0.86463	1.02136	0.44049
29	32 h	7	57.78	73.08	19.23	0.86352	1.02530	0.45395
30	32 h	8	65.22	66.67	20.00	0.94005	0.95535	0.46365
31	32 h	9	62.86	68.18	18.18	0.91546	0.97146	0.44049
32	32 h	10	63.33	52.63	15.79	0.92033	0.81171	0.40865
33	32 h	11	62.16	52.17	17.39	0.90823	0.80710	0.43016

MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO: Tiempo de maduración de ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca" en el desarrollo de embriones producidos por fecundación *in vitro*, Huancavelica 2011.

PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
<p>¿Cuál es el tiempo óptimo requerido para la maduración nuclear <i>in vitro</i> de ovocitos de alpaca y cómo influencia este en el desarrollo de embriones después de la Fecundación <i>in vitro</i>?</p>	<p>OBJETIVO GENERAL Determinar el tiempo óptimo de maduración nuclear <i>in vitro</i> de ovocitos de alpaca.</p> <p>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinar el tiempo óptimo (24, 48 y 32 horas) que requiere un ovocito de alpaca para llegar a la madurez nuclear (metafase I). • Determinar el tiempo óptimo de maduración para un mejor desarrollo de embriones de alpaca producidos <i>in vitro</i>. 	<p>Maduración nuclear: Se ha demostrado mediante detallados análisis citológicos de los eventos meióticos que tienen lugar durante la maduración, que los cambios en la cromatina nuclear ocurren en la fase folicular antes del pico de LH (Dague, 1980). Durante la fase de Vesícula Germinal 0 (GV0), la cromatina dispersa, característica de los ovocitos en la fase luteal, inicia una parcial condensación con agregados de cromatina irregulares alrededor del núcleo frente a la membrana nuclear (GV1). Según los estudios realizados por Motlik y Fuika (1986), los intervalos que se suceden desde la liberación de LH hasta la rotura de la vesícula germinal, tienen una duración aproximada de 20 a 24 horas y pueden dividirse en cuatro fases bien diferenciadas. Sobre las 8 a 10 horas posteriores a la exposición de LH, unos pocos agregados de cromatina se forman alrededor de la membrana nuclear (GV2), y a las 16 horas la mayoría de los ovocitos exhiben puntos de cromatina condensada y el comienzo de la formación de hebras (GV3). En la fase final, a las 20-24 horas después de LH, el nucleolo desaparece, la cromatina se condensa formando una red de bivalentes individuales y se produce la rotura de la membrana nuclear (GVBD).</p>	<p>A. VARIABLES INDEPENDIENTES</p> <ul style="list-style-type: none"> - Experimento 1: Tiempo (24, 28 y 32 horas) de maduración nuclear <i>in vitro</i> de los ovocitos de alpaca. - Experimento 2: Tiempo (24, 28, 32 horas) de maduración <i>in vitro</i>. <p>B. VARIABLE DEPENDIENTES</p> <ul style="list-style-type: none"> - Experimento 1: Estadio de maduración nuclear (VG, GVBD, MI y MII) <i>in vitro</i> de los ovocitos de alpaca. - Experimento 2: Estadio del desarrollo embrionario (% segmentación, % mórula y % blastocistos) de alpaca después de la FIV. 	<p>A. POBLACIÓN</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ovocitos de alpaca de categoría I y II • Embriones de alpaca <p>B. TAMAÑO DE MUESTRA</p> <ul style="list-style-type: none"> • 300 ovocitos de alpaca de categoría I y II <p>C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</p> <p>Las diferencias estadísticas de los experimentos 1 y 2 serán comparadas con un Diseño Completamente al Azar (DCA) Los datos se analizarán utilizando el paquete estadístico SAS v. 8.02 para Windows.</p>

Tiempo de maduración de ovocitos de *Vicugna pacos* “alpaca” en el desarrollo embrionario por fecundación *in vitro*

Paulo Santayana R.¹, José Mendoza M.², Leandra Landeo J.², Fidel Mujica L.¹, Jaime Ruiz B.²

¹ Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, Perú

² Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas, Facultad de Ciencias de Ingeniería, Universidad Nacional de Huancavelica, Huancavelica, Perú.

RESUMEN

Con el objetivo de determinar el tiempo óptimo de maduración nuclear *in vitro* de ovocitos de *Vicugna pacos* “alpaca” y evaluar la influencia de éste sobre el desarrollo embrionario post-fecundación *in vitro*, se utilizaron ovocitos de categoría I y II obtenidos por aspiración folicular de ovarios de alpacas sacrificadas en el Camal Municipal de Huancavelica, éstos fueron madurados en medio TCM-199 suplementado con HEPES 25mM, Piruvato de sodio 0.2 mM, Sulfato de gentamicina 50 µg/ml, FSH 0.02 unidades/mi, Estradiol 17-β 1 µg/ml y Suero Fetal Bovino al 10%, e incubados a 38.5°C en una atmósfera de aire estéril con 5% CO₂ y 90% de humedad por espacio de 24, 28 y 32 h. Transcurrido estos tiempos, los ovocitos fueron retirados del medio y sumergidos en una solución de Hialuronidasa al 0.1% para ser despojados de las células del cúmulo. Los ovocitos fueron fijados en una solución de metanol: ácido acético (3:1) y teñidos con orseina acética al 1% para evaluar el estadio de maduración nuclear (Vesícula Germinal-VG, Vesícula Germinal Rota-GVBD, Metafase I-MI, Metafase II-MII). Luego, se realizó la fecundación *in vitro* y se evaluó el desarrollo embrionario, para lo cual se procedió a madurar los ovocitos del mismo modo que en el ensayo anterior, conservando los tiempos de 24, 28 y 32 h. Se recuperaron espermatozoides epididimarios en medio Sperm-TALP para luego ser lavados y seleccionados mediante la técnica de Swim-up, se utilizó una concentración promedio de 1.5-2x10⁶ espermatozoides/mi para inseminar los ovocitos. Transcurridas las 18 h de fecundación, los presuntos cigotos fueron transferidos al medio mSOF-IVC e incubados por 7 días a 38.5°C, en una atmósfera de aire estéril con 5% CO₂ y 90% de humedad. Los resultados obtenidos muestran que el mayor porcentaje de maduración nuclear (ovocitos en estadio de metafase II- MII) fue alcanzado a las 32 h de cultivo *in vitro* con un 65.08%, seguida por el de 28 h con un 50.33% y finalmente el de 24 h con un 46.33%. Por otra parte, en cuanto a los resultados del desarrollo embrionario, se notó que los porcentajes de segmentación y blastocistos, aumentaron gradualmente hacia el mayor tiempo de maduración, siendo el de 32 h el tiempo con el mayor índice de desarrollo alcanzado, con un 60.17% y 17.02% para los estadios de segmentación y blastocisto respectivamente. Se concluye que el tiempo óptimo para la maduración nuclear y la adquisición máxima de la capacidad de desarrollo embrionario *in vitro*, de ovocitos de alpaca, fue de 32 h, bajo las condiciones del presente estudio.

Palabras claves: Ovocitos, Maduración *in vitro*, Metafase II, Fecundación *in vitro*, Embrión, alpaca.

I. INTRODUCCIÓN

La crianza de los Camélidos Sudamericanos, es una de las actividades de mayor importancia e impacto en el desarrollo socio económico de la población alto andina de nuestro país, no sólo por su capacidad de adaptación a las difíciles condiciones medioambientales, alturas entre los 3,000 a 5,000 msnm, sino por su utilización como una fuente alimenticia de proteína de origen animal, medio de transporte y como recurso para la producción de fibra de buena calidad (Huanca y col., 2007).

En la actualidad, la explotación de Camélidos Sudamericanos se lleva a cabo bajo sistemas tradicionales no siempre eficaces, agudizando problemas de morbilidad, mortalidad y baja eficiencia reproductiva (Cárdenas y col., 1999); donde las tasas de natalidad anual en la mayoría de explotaciones alpaqueras es del orden del 50% (Femández-Baca, 1993), con índices de fertilidad (Apaza y col., 1998) y preñez (Apaza y col., 2001) inferiores a 65% y 60% respectivamente; con un reemplazo inadecuado para la reproducción, desconocimiento de la fisiología reproductiva e inapropiado empleo de reproductores en el apareamiento (Apaza y col., 1998).

Pese a esta situación problemática, la aplicación de biotecnologías reproductivas podría contribuir rápidamente a superar estos bajos índices reproductivos logrando la multiplicación de animales de alto valor productivo formando núcleos genéticos que puedan proveer reproductores para los criadores de estos animales, y darles más sustento económico (Ruiz, 2009).

*Correspondencia

Paulo C. Santayana Rengifo
e-mail pasare24_7@hotmail.com
Celular: 966700470
Fac. Cs. Biológicas-UNSCH Ciudad
Universitaria
Av. Independencia s/n
Teléfono (066)-318553

37°C durante 30 minutos a 90% de humedad y 5% de CO₂, con una inclinación de 45°. Pasado los 30 minutos, se colectó el sobrenadante y se depositó en otro eppendorf para ser centrifugado a 1500 rpm por 3 minutos, se retiró el sobrenadante dejando una mínima cantidad y se homogenizó, se llevó a la incubadora por unos minutos hasta su utilización.

2.5. Fertilización de ovocitos

A cada gota de fecundación se añadió 5 µl de suspensión de espermatozoides capacitados, con una concentración final aproximada de 1.5 – 2 x10⁶ espermatozoides/ml. Ovocitos y espermatozoides se mantuvieron juntos, en la incubadora durante 18 horas a 38.5°C, 90% de humedad y 5% de CO₂.

2.6. Cultivo de embriones

Luego de la inseminación, los ovocitos se cultivaron por 7 días en gotas de 50 µl de Medio Fluido Oviductal Sintético (SOF-IVC) suplementado con 3 mg/ml de BSA en una incubadora a 38.5°C, 90% de humedad y 5% de CO₂.

2.7. Diseño estadístico

Las diferencias estadísticas de los experimentos (maduración nuclear de ovocitos y desarrollo embrionario) fueron comparadas utilizando análisis de varianza (ANOVA, α=0.05) después de la transformación arcsen de los datos. Se utilizaron la prueba de Duncan para contrastar la diferencia entre promedios. El modelo estadístico a utilizar para describir una observación fue: $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$

III. RESULTADOS

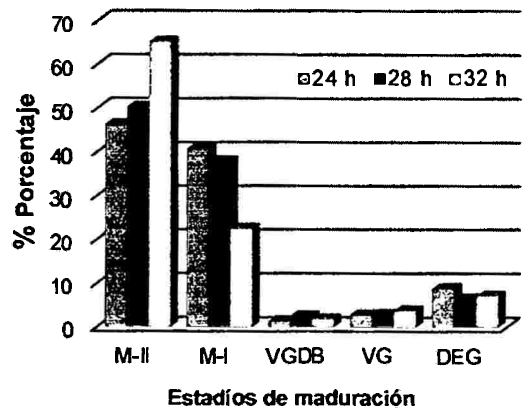


Figura 01. Porcentaje de ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca" en estadio de Metafase II (M-II), Metafase I (M-I), Vesícula Germinal Rota (GVBD), Vesícula Germinal (VG) y degenerados.

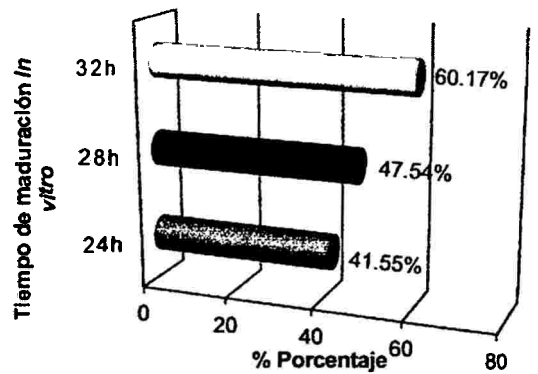


Figura 02. Porcentaje total de embriones segmentados luego de 48 horas de fecundación in vitro.

Tabla 01. Efecto del tiempo de maduración in vitro en el porcentaje (media ± SD) de maduración nuclear de ovocitos colectados de ovario de *Vicugna pacos* "alpacas". Camal Municipal de Huancavelica (noviembre – abril, 2012)

Tiempo de Maduración in vitro	N° Total de Ovocitos (Réplica)	Estadios de maduración nuclear					
		% Ovocitos Inmaduros			% Ovocitos Maduros		% Ovocitos Degenerado
		VG	GVBD	M-I	M-II		
24h	217 (10)	2.81 ± 2.70 ^a	1.32 ± 1.83 ^a	40.71 ± 11.64 ^a	46.33 ± 8.45 ^a	8.83 ± 4.46 ^a	
28h	215 (10)	2.87 ± 3.15 ^a	2.50 ± 3.62 ^a	37.91 ± 9.74 ^a	50.33 ± 5.17 ^a	6.39 ± 4.60 ^a	
32h	222 (10)	3.71 ± 4.87 ^a	1.74 ± 2.35 ^a	22.42 ± 8.48 ^b	65.08 ± 10.69 ^b	7.05 ± 4.40 ^a	

Fuente: Elaboración propia.

VG: Vesícula Germinal; GVBD: Vesícula Germinal Rota; M-I: Metafase I; M-II: Metafase II

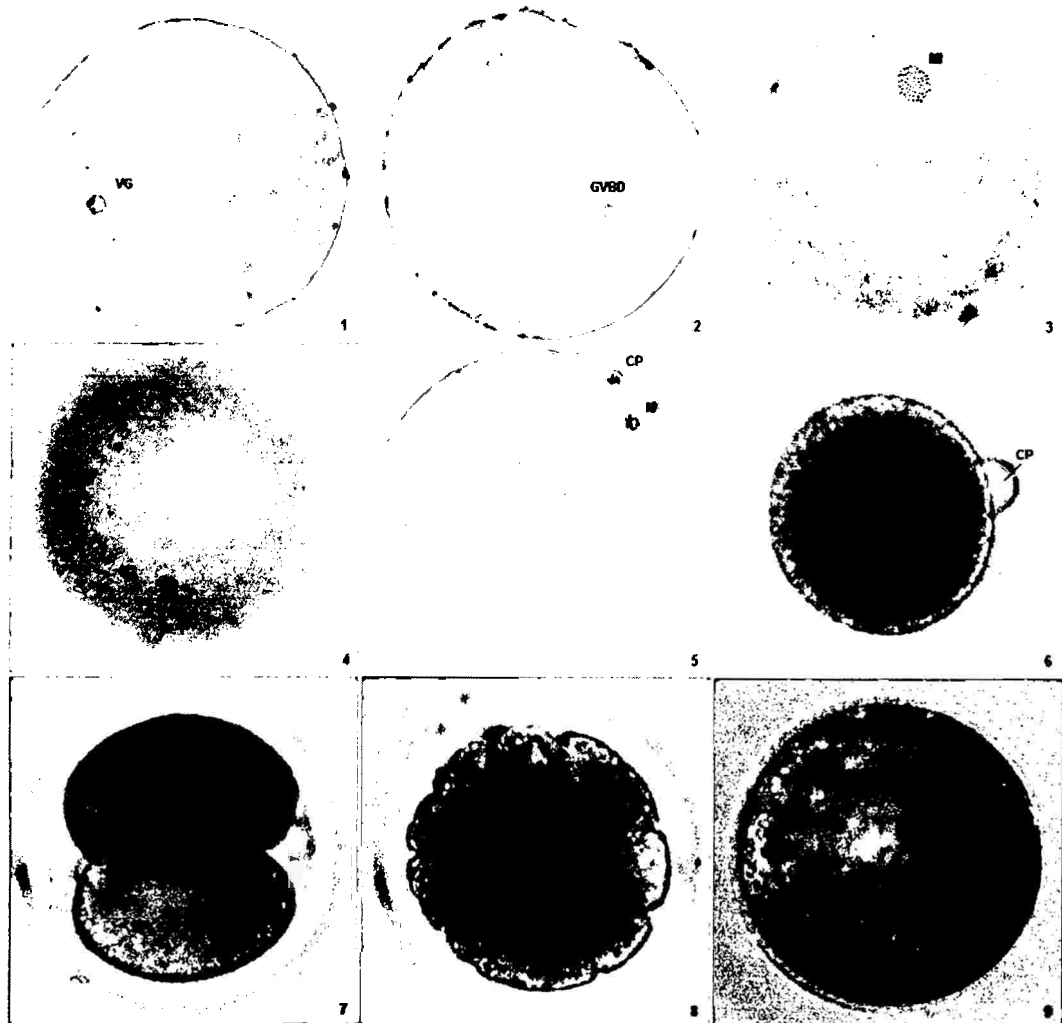
^{a,b} Letras diferentes en la misma columnas denotan diferencias estadísticas significativas (p<0.05). SD: Desviación Estandar.

Tabla 02. Efecto del tiempo de maduración in vitro de ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca" en el porcentaje (media ± SD) de desarrollo embrionario luego de la fecundación in vitro.

Tiempo de maduración in vitro	N° Total de Ovocitos inseminados (Réplicas)	Estadios del desarrollo embrionario (% ± SD)		
		Segmentación (48 h)	Mórula (4 días)	Blastocisto (7 días)
		24 h	392 (11)	163/392 (41.55 ± 3.65) ^a
28 h	456 (11)	217/456 (47.54 ± 2.91) ^b	154/217 (71.06 ± 5.84) ^a	31/217 (14.19 ± 1.70) ^b
32 h	368 (11)	221/368 (60.17 ± 3.09) ^c	153/221 (69.39 ± 9.31) ^a	38/221 (17.02 ± 2.14) ^c

Fuente: Elaboración propia.

^{a,b,c} Letras diferentes en la misma columnas denotan diferencias estadísticas significativas (p<0.05). SD: Desviación Estandar.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 03. Ovocitos y embriones de alpaca. Microscopio óptico (Leica CME) y Microscopio invertido (Novel Ningbo XDS-403AT). Objetivo 40X. 1) Ovocito en Vesícula Germinal (VG); 2) Ovocito en Vesícula Germinal Rota (GVBD); 3) Ovocito en Metafase I (MI); 4) Ovocito en Anafase I (A); 5, 6) Ovocito en Metafase II (MII); 7) Embrión de dos células; 8) Mórula; 9) Blastocisto.

IV. DISCUSIONES

Recuperación de ovarios y selección de ovocitos

La recuperación de ovarios y la selección de ovocitos, representan la etapa inicial de este proceso. En general, los ovarios recuperados en el Camal, provienen de hembras de diferentes edades y condiciones fisiológicas.

Se seleccionaron y aspiración 1551 folículos de superficie clara provenientes de 173 ovarios (OVR) de alpaca recolectados del Camal Municipal de Huancavelica, lo que produjo una cifra media de 8.9 ± 1.22 folículos por ovario (máximo 30 - mínimo 1), se descartó inmediatamente aquellos que presentaban folículos quísticos y hemorrágicos. Por otro lado, del total de folículos aspirados se recuperaron 862 ovocitos (OVT), lo que supone un 56.67% de recuperación de ovocitos con respecto al número total de folículos ováricos aspirados.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, indican que el número promedio de ovocitos aspirados por ovario de alpaca fue de 5.04 ± 1.27 (Tabla 03). Estos resultados se ubican en un rango superior a lo informado por Ruiz y col. (2007) que reportaron un total de 3.5 COCs/ovario; pero inferior a lo reportado por

Gamarra y col. (2008) que obtuvieron una media de 8.5 ovocitos/ovario de alpaca. Es importante señalar que esta variabilidad puede estar motivada por la experiencia del operador en la colección de los ovocitos y a las variaciones propias de los ovarios (edad del animal, raza y estado reproductivo).

De todos los ovocitos recuperados, en este estudio, se seleccionaron como aptos (OVA) para la maduración y fecundación *in vitro* un total de $69.24 \pm 1.54\%$, divididos en dos categorías morfológicas (I y II). Este valor, es similar al 69% obtenido por Ruiz y col. (2007); pero inferior al 89% y 81% indicados por Ratto y col. (2007) y Gamarra y col. (2008) respectivamente.

Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente estudio, indican que sobre un total de 862 ovocitos colectados, seleccionados y clasificados, se obtuvieron $19.75 \pm 4.10\%$ de ovocitos en categoría I, $49.49 \pm 4.99\%$ categoría II, $16.64 \pm 1.41\%$ categoría III y $14.12 \pm 1.26\%$ categoría IV. Estos valores difieren con el trabajo reportado por Ramos (2009), posiblemente debido a que en dicho trabajo el tamaño de muestra fue bajo. Otros autores (Mendoza y col., 2008), utilizaron también

diferentes categorías morfológicas, principalmente la I y II sin mostrar resultados de la selección y clasificación.

El número de ovocitos aptos y no aptos por ovario fue de 3.49 ± 0.87 y 1.56 ± 0.41 respectivamente.

El análisis estadístico (media y desvío estándar) de los caracteres analizados (OVT/OVR, OVA/OVR y OVNA/OVR), indica que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las réplicas.

Evaluación del estado nuclear de los ovocitos

Como se ha señalado en la primera parte, el objetivo de este estudio fue determinar el tiempo óptimo de maduración nuclear *in vitro* de ovocitos de alpaca, dada la escasez de literatura existente al respecto.

La información concerniente a este tema, indica que la maduración de ovocitos de mamíferos está implicada estrechamente en tres sucesos importantes: la progresión meiótica, la regulación de la penetración espermática y la descondesación de la cabeza del espermatozoide (Swain y Smith, 2007). Por todo esto, la adquisición de la capacidad de desarrollo por parte de los ovocitos madurados *in vitro* es un factor limitante para que se puedan alcanzar con éxito las fases de fecundación, división y desarrollo embrionario (Eppig, 1994). Otra de las causas resalantes de la importancia de determinar el tiempo óptimo en la maduración *in vitro* de ovocitos se ilustra, también, mediante los resultados de los estudios en animales que muestran que el envejecimiento de ovocitos puede ser la causa de la fertilidad reducida si la inseminación *in vivo* se retrasa (Hunter, 1989). Además, el retraso de la inseminación *in vitro* se ha asociado con la capacidad del ovocito de ser fertilizado pero no llegar a desarrollarse hasta estados embrionarios superiores, esto como resultado de los trastornos en los gránulos corticales y los microtúbulos (Long y col., 1994).

En el presente estudio se evaluó el efecto del tiempo de maduración *in vitro* sobre el porcentaje de maduración nuclear de ovocitos de alpaca, estableciéndose para esto, tres tiempos de cultivo específicos: 24, 28 y 32 h; de esta manera, se pudo obtener los valores porcentuales del total de ovocitos en cada estadio meiótico alcanzado (Vesícula Germinal, Vesícula Germinal Rota, Metafase I y Metafase II) (Tabla 01). Así se observó que, tras 32 h de cultivo, la tasa de maduración nuclear en estadio de metafase II (ovocitos maduros) (Figura 02 y 03) alcanzó un $65.08 \pm 10.69\%$, seguida de un $50.33 \pm 5.17\%$ a las 28 h y finalmente un $46.33 \pm 8.45\%$ a las 24 h de cultivo *in vitro*. En cuanto a la media porcentual de ovocitos inmaduros en el estadio de metafase I (M-I) se observó una disminución gradual hacia el mayor tiempo de cultivo, es decir, disminuyó de un $40.71 \pm 11.64\%$ (24 h) a un $22.42 \pm 8.48\%$ (32 h). Para los ovocitos en estadio de Vesícula Germinal (VG), Vesícula Germinal Rota (GVBD) y degenerados, se obtuvo una tasa promedio de 3.13%, 1.85% y

7.57% respectivamente; notándose una tendencia paralela en los tres tiempos de cultivo. Existen pocas publicaciones sobre este tema.

Existen pocas publicaciones sobre este tema. Huanca y col. (2009), utilizando tres tiempos para la maduración *in vitro* de ovocitos en medio TCM-199 suplementado con FCS 10% (v:v), FSH 0.5 mg/ml, hCG 10 ml/g, 0.2 mM de piruvato sódico, 50 mg/ml de gentamicina y 1 mg/ml estradiol, lograron obtener 18.9%, 42.9% y 65.8% de ovocitos en metafase II (M-II) a las 30, 34 y 38 h de cultivo, respectivamente. Así mismo, Condori y col. (2010) utilizando 42 h de maduración *in vitro* de ovocitos en medio TCM-199 suplementado con 10% FCS, 10 mg/ml de hCG, 0.2 mM piruvato de sodio, 50 mg/ml de gentamicina, 1 mg/ml de estradiol y 0.5 mg/ml de FSH, obtuvieron 64.9% de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II.

Comparando dichas investigaciones con los resultados obtenidos en este estudio, se observó una diferencia marcada en el porcentaje de maduración nuclear de ovocitos (M-II) a las 28 y 32 h. Notándose que los resultados que se presentan en este estudio superan altamente a los valores obtenidos por Huanca y col. (2009), pero se asemejan al resultado obtenido por Condori y col. (2010). Probablemente estas diferencias se deben a factores como: características de las hembras sacrificadas en el camal, el tiempo de transporte de las muestras al laboratorio y, sobre todo, a la selección y clasificación de ovocitos recogidos tras la punción folicular; se descarta la posibilidad de la influencia del medio de maduración, pues en los dos estudios se utilizaron los mismos componentes para su preparación.

Otros autores han evaluado la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca, luego de la superovulación de hembras con FSH y eCG. Gómez y col. (2002), utilizando 26 h para la MIV de ovocitos recuperados por laparotomía ventral, obtuvieron 46% (FSH) y 40% (eCG) de ovocitos en metafase II. Ratto y col. (2007) mejoró los resultados obtenidos por Gómez alcanzando 82% y 64% de ovocitos en metafase II para los mismos tratamientos superovulatorios.

El estudio estadístico de las variables analizadas en la maduración *in vitro* de ovocitos, demuestra que no existen diferencias significativas entre los dos primeros tiempos 24 y 28 h, pero sí a las 32 h de cultivo. Estos resultados indican que el tiempo óptimo para la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca, en este estudio, es de 32 h.

Fertilización y evaluación del desarrollo de embriones *in vitro*

Una vez conseguida la maduración *in vitro* de los ovocitos, una de las formas más eficaces, para demostrar si dicha maduración se produjo correctamente, es comprobar la capacidad de estos ovocitos para ser fecundados *in vitro* y alcanzar con éxito las fases de división y desarrollo embrionario.

La mayoría de los trabajos realizados en fertilización *in vitro* de Camélidos Sudamericanos, utilizan semen epididimario

para el cocultivo con los ovocitos madurados *in vitro*. El procesamiento del semen incluye el lavado, la selección y la capacitación de las células espermáticas.

En el presente estudio, se ha realizado el lavado del semen epididimario por medio de centrifugaciones consecutivas a 1500 RPM, y utilizando la técnica de Swim-up se seleccionaron y capacitaron espermatozoides.

Se empleó una relación de 10 a 15 ovocitos/gota y $1.5-2 \times 10^6$ espermatozoides/ml, teniendo en cuenta que se ha utilizado los resultados de la especie bovina como referencia, pues no existe bibliografía alguna sobre estos estudios en Camélidos Sudamericanos..

Luego del proceso de fecundación *in vitro*, los supuestos cigotos fueron pasados al medio Fluido Oviductal Sintético (SOF-IVC) suplementado con 3 mg/ml de BSA e incubados durante 7 días, para luego evaluar el desarrollo embrionario.

En este estudio el porcentaje de embriones divididos, del total de ovocitos inseminados fue de $41.55 \pm 3.65\%$, $47.54 \pm 2.91\%$ y $60.17 \pm 3.09\%$ de ovocitos madurados *in vitro* a 24, 28 y 32 h respectivamente (Tabla 06, Figura 15 y 17). Y el porcentaje de blastocisto, que se obtuvo del total de embriones divididos, fue de $11.03 \pm 2.08\%$, $14.19 \pm 1.70\%$ y $17.02 \pm 2.14\%$ de ovocitos madurados a 24, 28 y 32 h respectivamente (Figura 16 y 19).

Estos porcentajes superan ampliamente a los reportados por Huanca y col. (2009) que utilizando tres tiempos para la maduración *in vitro* de los ovocitos, previo a la fertilización, obtuvieron una tasa de división del 9.5%, 7.7% y 27.5% ($p < 0,05$), para 30, 34 y 38 h respectivamente. Condori y col. (2010) utilizando 42 h para la maduración *in vitro* de ovocitos, obtuvieron una tasa de división y blastocisto del 39.1% y 13.6% respectivamente. Ochante R. (2010) obtuvo una tasa de división del 19.28%, 21.86%, 1.86% y 0.29% de ovocitos madurados a 24, 26, 48, 72 h respectivamente.

En otras investigaciones, Gamarra y col. (2008) utilizando 30 h de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca, e inseminándolos con espermias congelados/descongelados, obtuvieron 21.7% (71/262) de división a las 72 horas, 29% (21/71) de mórulas y blastocistos a los 5 días y 4.22% (3/71) de blastocistos eclosionados a los 7 días de incubación en medio SOF suplementado. Por otro lado, Mendoza y col., 2008, utilizando 25 h de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca y fertilizándolos con espermatozoides epididimarios recuperados por dos métodos (Gradiente Percoll y Swim-up), obtuvieron 36.0% y 43.9% de segmentación, y 6.3% y 6.9% de blastocistos para Percoll y Swim-up respectivamente.

El análisis estadístico, muestra que los porcentajes de segmentados y blastocistos, difieren significativamente ($P > 0,05$) en los tres tiempos (24, 28 y 32 h) de maduración *in vitro*, pero no así, para los porcentajes de mórulas donde no existen diferencias significativas ($p > 0,05$). De todos estos resultados, podemos decir que el tiempo de maduración *in vitro* requerido para que el ovocito adquiera la

máxima capacidad de desarrollo embrionario es de 32 h de cultivo.

V. CONCLUSIÓN

El tiempo óptimo para la maduración nuclear y la adquisición máxima de la capacidad de desarrollo embrionario *in vitro*, de ovocitos de alpaca, fue de 32 horas; bajo las condiciones del presente estudio.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Apaza, N.; Olarte, U. y Málaga, J. 1998. Empadre controlado de alpacas Huacaya en el Banco de Germoplasma de la E.E. ILLPA Puno. Memorias de la XXI Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Universidad Nacional del Altiplano. Puno-Perú.
2. Apaza, N.; Sapana, R.; Huanca, T. y Huanca, W. 2001. Inseminación Artificial en alpacas con semen fresco en comunidades campesinas. Memorias de la XIV Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú
3. Blondin, P. and Sirard, M. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. Mol. Reprod. Dev. 41, pp. 54-62.
4. Boelhauve, M.; Sinowatz, F.; Wolf, E. and Paulalopes, F. 2005. Maturation of Bovine Oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of *in vitro*-produced blastocysts. Biol of Reprod. 73, pp. 737-744.
5. Cárdenas, O.; Huanca, T.; Sapana R. y Alarcón, V. 1999. Avances de inseminación artificial de llamas con semen congelado. XXII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Huancavelica – Perú.
6. Condori, R.; Huanca, W.; Chileno, M.; Cainzo, J.; Valverde, F.; Becerra, J.; Quintela, L.; and Herradon, P. 2010. Effect of follicle-stimulating hormone addition on *in vitro* maturation and cleavage of alpaca (*Vicugna pacos*) embryos. Reprod. Fert. And Dev. 23 (1), pp. 224
7. Donnay, I.; Auquier, P.; Kaidi, S.; Carolan, C.; Lonergan, P.; Mermillod P. and Massip, A. 1998. Vitrification of *in vitro* produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. Anim Reprod Sci. 52, pp. 93 -104.
8. Eppig, J.; Schultz, R.; O'Brien, M. and Chesnel, F. 1994. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. Dev. Biol. 164, pp. 1 – 9
9. Fernández-Baca, S. 1993. Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. *Animal Reproduction Science*. 33, pp. 307 - 323.
10. Gamarra, G.; Huamán, E.; León, M.; Carpio, S.; Alvarado, E.; Asparrin, M. and Vivanco, W. 2008. First *in vitro* embryo production in alpacas (*Jama pacos*).

- Reproduction, Fertility and Development* 21, 177-178.
11. **Gómez, C.; Ratto, M.; Berland, M.; Wolter, M. and Adams, G.** 2002. Superstimulatory response and oocyte collection in Alpacas. *Theriogenology* 57, pp. 584 (abstract).
 12. **Huanca, W.; Condori, R.; Cainzos, J.; Chileno, M.; Quintela, L.; Becerra J. and Herradon, P.** 2009. *In Vitro* Maturation and *In Vitro* Fertilization of Alpaca (*Vicugna Pacos*) Oocytes: Effect Of Time Of Incubation On Nuclear Maturation And Cleavage. *Reproduction, Fertility and Development* 22(1), pp. 327 – 327.
 13. **Huanca, W.; Palomino, J.; Cervantes, M.; Cordero, A. and Huanca, T.** 2007. Efecto de temperaturas de transporte (35°C, 4°C) sobre la calidad morfológica de ovocitos colectados desde ovarios de alpacas. APPA -ALPA- Cusco, Perú, 2007.
 14. **Hunter, H. and Greve, T.** 1997. Could artificial insemination of cattle be more fruitful? Penalties associated with aging eggs. *Reprod. Dom. Anim.* 32, pp. 137 -142.
 15. **Hunter, R.** 1989. Aging of the unfertilised cow egg in vivo: how soon is fertility compromised. *Vet Rec*; 124, pp. 489– 490.
 16. **Long, C.; Damiani, P.; Pinto-Correia, C.; Maclean, R.; Duby, R. and Robl, J.** 1994. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured in vitro under various conditions of fertilization. *J Reprod Fertil.* 102, pp. 361 – 369.
 17. **Mendoza, J.; Ayuque, A.; Triviño, F.; Ayuque, G.; Landeo, L. y Ruiz, J.** 2008. Evaluación de dos métodos de recuperación de espermatozoides epididimarios para la fecundación in vitro de ovocitos de alpaca. Efecto de la exposición a etilenglicol sobre el desarrollo partenogenético in vitro de ovocitos de alpaca. XXXI Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Lima.
 18. **Ochante, R.** 2010. Evaluación del tiempo de maduración de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones de *Lama pacos* "alpaca". Ayacucho 2009. Tesis para optar el título profesional de Bióloga. Universidad San Cristóbal de Huamanga – Ayacucho.
 19. **Ramos, E.** 2009. Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de *Vicugna pacos* "Alpaca". Tesis de Maestría. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. Pp. 31 – 32
 20. **Ratto, M.; Berland, M.; Huanca, W.; Singh, J. and Adams, G.** 2005. *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes. *Theriogenology* 63, pp. 2445 - 2457
 21. **Ratto, M.; Gómez, C.; Berland, M. and Adams, G.** 2007. Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Animal Reproduction Science* 97, pp. 246 - 256.
 22. **Ratto, M.; Huanca, W.; Singh, J. and Adams G.** 2004. Effect of natural mating LH or GnRH administration on interval to ovulation and corpus luteum development in llamas. 15th International Congress of Animal Reproduction; 1, pp. 147 (abstract).
 23. **Ruiz, J.** 2009. Vitrificación de ovocitos de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis de Doctorado, para optar el grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
 24. **Ruiz, J.; Correa, J.; Ayuque, G.; Landeo, L.; Yaranga, M. y Zacarías, A.** 2007. Producción *in vitro* de embriones partenogenéticos de alpaca y llama. I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú.
 25. **Swain, E. and Smith, G.** 2007. Reversible phosphorylation and regulation of mammalian oocyte meiotic chromatin remodeling and segregation. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 63, pp. 343 - 358.

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
R.D. N° 307-2012-FCB-D
Bach. Paulo Cesar Santayana Rengifo

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del día viernes veintiuno de setiembre de dos mil doce, en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, bajo la presidencia del Mg. Pedro Ayala Gómez encargado según memorándum N° 447-2012-UNSCHE-FCB en representación del Dr. Segundo Tomas Castro Carranza decano de la Facultad de Ciencias Biológicas y con la asistencia de los miembros Mg. Fidel Mujica Lengua, M.V. Florencio Cisneros Nina, Biga. Sonia Palomino Felices (cuarto jurado) actuando como secretaria docente según memorándum N° 448-2012-UNSCHE-FCB, para recepcionar la sustentación de tesis: Tiempo de maduración de ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca" en el desarrollo de embriones producidos por fecundación *in vitro*, Huancavelica 2011, presentado por el Bach. Paulo Cesar Santayana Rengifo, quien pretende optar el Título Profesional de Biólogo, Especialidad de Biotecnología.

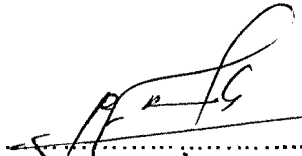
El Presidente(e) inició el Acto de Sustentación solicitando a la Secretaria Docente(e) la revisión de la documentación y la lectura de la R.D. N° 307-2012-FCB-D instruyendo al sustentante a que inicie el Acto de Sustentación del trabajo de investigación en un tiempo no mayor de cuarenta y cinco minutos.

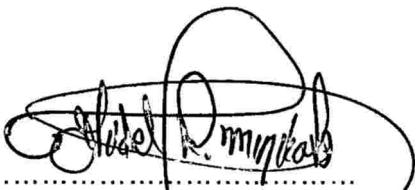
Culminada la exposición, se inició el siguiente periodo en el cual los miembros del Jurado Calificador realizaron las preguntas, observaciones y aclaraciones que consideraron convenientes para la evaluación del sustentante.

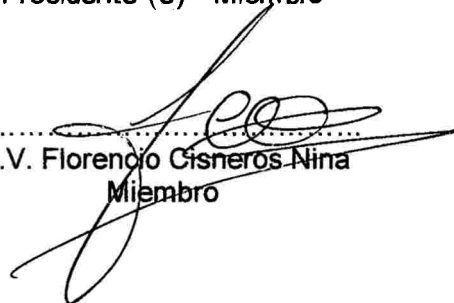
Luego el Presidente(e) invitó al sustentante y a los asistentes al Acto de Sustentación, que abandonen el auditorio para que el Jurado Calificador pueda deliberar y emitir la calificación. Como sigue:


Jurado Calificador	Exposición	Respuestas	Promedio
Mg. Pedro Ayala Gómez	18	18	18
Mg. Fidel Mujica Lengua	19	18	19
M.V. Florencio Cisneros Nina	16	16	16
Biga. Sonia Palomino Felices	19	19	19
Promedio			18

De la calificación del Jurado Evaluador, el sustentante obtiene la nota de DIECIOCHO (18) de la cual dan fe los miembros, estampando su firma al final del acta presente. Culmina el acto de sustentación siendo las seis y veinticinco.


.....
Mg. Pedro Ayala Gómez
Presidente (e) – Miembro


.....
Mg. Fidel Mujica Lengua
Miembro - Asesor


.....
M.V. Florencio Cisneros Nina
Miembro


.....
Biga. Sonia H. Palomino Felices
Miembro – Secretaria (e)