

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Efecto de factores de crecimiento sobre la tasa de
maduración de ovocitos y desarrollo embrionario
in vitro de alpaca

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Presentado por la:
Bach. GUILLÉN PALOMINO, Crissthel Yverlin

AYACUCHO – PERÚ
2018

A Dios, a mis queridos padres: Augusto y Eulogia, a mis hermanos: Willy y Yosselyn y a mis sobrinos, quienes son el motivo de mi superación y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, mi *Alma Mater*, a la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial a la Escuela Profesional de Biología y al Área Académica de Biotecnología que me brindaron las herramientas necesarias y valiosas que contribuyeron en mi formación profesional.

A la Estación Experimental Agraria Canaán-INIA-Ayacucho, de manera particular al Programa Nacional de Investigación en Camélidos Sudamericanos (PNI – Camélidos) por el financiamiento de la tesis y por permitir la utilización de sus equipos, reactivos y establecimiento en general, los cuales fueron importantes para la ejecución y culminación de mi tesis.

Al Matadero Municipal de Huancavelica, por permitir el uso de sus instalaciones para la recolección de muestras.

Al Blgo. Fidel Mujica Lengua, Ing. Mary Luz Naveros Flores y M. V. Mijaíl Contreras Huamaní; por la dirección, asesoría, disposición, apoyo y la confianza depositada, que permitieron la elaboración, ejecución y culminación del presente informe.

Al Blgo. Reynán Cóndor Alarcón, por su apoyo, amistad, amabilidad y colaboración en el asesoramiento estadístico.

A mis queridos padres por ser ejemplos de perseverancia y constancia, por el valor mostrado para salir adelante, por su amor incondicional y por sus palabras de aliento que fueron claves para poder culminar esta etapa.

A mis hermanos, tíos (as), primos (as) y cuñada que supieron apoyarme en todo momento; sobre todo, por brindarme todo su cariño, comprensión y paciencia.

A mis amigos (as): Carlos, Jackeline, Erika, Paulo, Lucy, Yanet, Ever, Yanina, y Zilda, por sus constantes palabras de aliento y orientación en el desarrollo de la tesis; a Walter, Ronal, Edwin, Miguel, Andrés, Doris, Ida y Jhon Percy por su apoyo, amistad, amabilidad y por el buen ambiente de trabajo durante el tiempo de estadía en el laboratorio.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Fisiología ovárica	6
2.2.1. Ovogénesis	6
2.2.2. Foliculogénesis	7
2.2.3. Ovocito	8
2.3. Maduración del ovocito	8
2.3.1. Maduración nuclear	9
2.3.2. Maduración citoplasmática	10
2.4. Factores de crecimiento	13
2.4.1. Factor de Crecimiento Epidermal (EGF)	14
2.4.2. Factor de Crecimiento Similar a la Insulina tipo I (IGF-I)	15
2.5. Producción in vitro de embriones	17
2.5.1. Obtención de ovarios	18
2.5.2. Recuperación de Complejos Cúmulo-Ovocito (CCO)	18
2.5.3. Selección y clasificación de ovocitos	19
2.5.4. Maduración In Vitro de ovocitos (MIV)	19
2.5.5. Fecundación In Vitro (FIV)	22
2.5.6. Cultivo In Vitro de embriones (CIV)	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. Localización de la zona de investigación y muestreo	25
3.2. Población y muestra	25
3.3. Maduración In Vitro de ovocitos (MIV)	25
3.3.1. Obtención de ovarios	25
3.3.2. Recuperación y selección de ovocitos	26

3.3.3. Maduración In Vitro de ovocitos (MIV)	26
3.3.4. Valoración del estadio nuclear de los ovocitos	27
3.4. Fecundación In Vitro de presuntos cigotos (FIV)	27
3.4.1. Recuperación y selección de espermatozoides	27
3.4.2. Preparación de los ovocitos	28
3.4.3. Cocultivo de ovocitos y espermatozoides	29
3.5. Cultivo In Vitro de embriones (CIV)	29
3.6. Evaluación de los resultados	29
3.6.1. Clasificación de ovocitos	29
3.6.2. Evaluación del estadio nuclear de los ovocitos	29
3.6.3. Evaluación del desarrollo embrionario	29
3.7. Diseño estadístico	29
IV. RESULTADOS	33
V. DISCUSIÓN	53
5.1. Recolección de ovarios, recuperación y selección de ovocitos	53
5.2. Evaluación del estadio nuclear de los ovocitos	56
5.3. Evaluación del desarrollo embrionario temprano in vitro	58
VI. CONCLUSIONES	63
VII. RECOMENDACIONES	65
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	73

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Recuperación de ovocitos (media $\pm$ SD) mediante la técnica de disección-ruptura folicular de ovarios de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	35
Tabla 2	Categorización morfológica (media $\pm$ SD) de ovocitos recuperados de ovarios de alpaca, mediante la técnica de disección-ruptura folicular, según calidad. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	36
Tabla 3	Porcentaje promedio de ovocitos de alpaca aptos para la maduración in vitro, recuperados mediante la técnica de disección-ruptura folicular. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	39
Tabla 4	Efecto de factores de crecimiento en el porcentaje (media $\pm$ SD) de los estadios de maduración nuclear de ovocitos de alpaca, según tratamiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	41
Tabla 5	Tasa de maduración nuclear (media $\pm$ SD) de ovocitos de alpaca madurados in vitro con factores de crecimiento, según tratamiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	44
Tabla 6	Efecto de factores de crecimiento en el medio para MIV sobre el porcentaje (media $\pm$ SD) de desarrollo embrionario in vitro de alpaca, según tratamiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	46
Tabla 7	Tasa de desarrollo embrionario de alpaca (media $\pm$ SD) y mediana, cultivados in vitro con adición de factores de crecimiento al medio para MIV, según tratamiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA-Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	50

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Relación entre ovogénesis, foliculogénesis y meiosis	12
Figura 2	Secuencia de aminoácidos y ubicación de los enlaces disulfuro del EGF de ratón	14
Figura 3	Secuencia de aminoácidos de Somatomedina-C / IGF-I	16
Figura 4	Flujograma de producción in vitro de embriones de alpaca, utilizando factores de crecimiento en la suplementación del medio de maduración. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	31
Figura 5	Porcentaje promedio de la categorización morfológica de ovocitos de alpaca, según calidad. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	37
Figura 6	Categorías morfológicas de ovocitos de alpaca, según calidad. Estereoscopio (Motic, SMZ-168). Objetivo 20X. (A) Calidad I: Ovocito con más de 5 capas de células del cúmulo compacto, claro y transparente; (B) Calidad II: Ovocito rodeado por 2-4 capas células del cúmulo; (C) Categoría III: Ovocito parcialmente rodeado por células de cúmulo, entre uno o menos; (D) Categoría IV: Ovocito desnudo, rodeado sólo por la zona pelúcida. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	38
Figura 7	Porcentaje promedio de ovocitos de alpaca aptos y no aptos para la maduración in vitro, recuperados mediante la técnica de disección-ruptura folicular. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	40
Figura 8	Porcentaje promedio de ovocitos de alpaca en estadio de Metafase II (MII), Metafase I (MI), Vesícula Germinal Rota (VGBD), Vesícula Germinal (VG) y degenerados (DEG), según tratamiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	42
Figura 9	Estadíos de maduración nuclear de ovocitos de alpaca. Tinción con orceína acética al 2%. Microscopio óptico (ACCU-SCOPE).	43

	Objetivo 40X. (A) Vesícula Germinal (VG); (B) Vesícula Germinal Rota (VGBD); (C) Meiosis I, (D y F) Metafase II (MII), presencia del Primer Cuerpo Polar (CP) y (E) Ovocito Degenerado. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	
Figura 10	Comparación de medianas de ovocitos de alpaca en Metafase II, madurados in vitro con factores de crecimiento, según tratamiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	45
Figura 11	Porcentaje de desarrollo embrionario de alpaca en estadíos de Segmentados (SEG), Mórulas (MOR), Blastocistos (BLA) y degenerados (DEG), según tratamiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	47
Figura 12	Comparación de medianas de mórulas de alpaca con adición de FC al medio para MIV, según tratamiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	48
Figura 13	Comparación de medianas de blastocistos de alpaca con adición de FC al medio para MIV, según tratamiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	49
Figura 14	Comparación de medianas de embriones de alpaca con adición de FC al medio para MIV, según tratamiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	51
Figura 15	Estadíos de desarrollo embrionario de alpaca, después de 07 días de CIV. Microscopio invertido (AXIO). Objetivo 40X. (A) embrión en división de dos células; (B y C) embrión en división de cuatro células; (D) embrión en estadio de mórula; (E) embrión en estadio de blastocisto expandido; (F) embrión en estadio de blastocisto protruido. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	52

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1	75
Composición de los medios de cultivos utilizados en la producción in vitro de embriones de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	
Anexo 2	77
Soluciones stock necesarias para la preparación de los diferentes medios utilizados en la producción in vitro de embriones de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	
Anexo 3	79
Proceso de la preparación de soluciones stock para la producción in vitro de embriones de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	
Anexo 4	80
Proceso de la preparación de medios de cultivo para la producción in vitro de embriones de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	
Anexo 5	81
Flujograma de la producción in vitro de embriones de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	
Anexo 6	84
Ovocitos de alpaca recuperados mediante la técnica de disección-ruptura folicular. Estereoscopio (Motic, SMZ-168). Objetivo 20X. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	
Anexo 7	85
Ovocitos de alpaca madurados con factores de crecimiento. Estereoscopio (Motic, SMZ-168). Objetivo 30X. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	
Anexo 8	86
Proceso de tinción de ovocitos de alpaca, con orceína acética al 2%. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	
Anexo 9	87
Proceso de recuperación de espermatozoides de alpaca a partir de epidídimos de testículos procedentes de matadero.	

	Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)	
Anexo 10	Análisis de varianza de la tasa de maduración nuclear de ovocitos de alpaca. Ayacucho, noviembre 2017	88
Anexo 11	Análisis de comparación múltiple de la tasa de maduración nuclear de ovocitos de alpaca, prueba de Duncan a un nivel de confianza de 95%. Ayacucho, noviembre 2017	88
Anexo 12	Análisis de varianza de la tasa de ovocitos degenerados de alpaca, después de la maduración in vitro. Ayacucho, noviembre 2017.	88
Anexo 13	Análisis de comparación múltiple de ovocitos degenerados de alpaca, después de la maduración in vitro, prueba de Duncan a un nivel de confianza de 95%. Ayacucho, noviembre 2017	88
Anexo 14	Prueba de Kruskal-Wallis para los porcentajes promedio de ovocitos de alpaca en estadio de Vesícula Germinal (VG) después de la maduración in vitro. Ayacucho, noviembre 2017	89
Anexo 15	Prueba de Kruskal-Wallis para los porcentajes promedio de ovocitos de alpaca en estadio de Vesícula Germinal Rota (VGBD) después de la maduración in vitro. Ayacucho, noviembre 2017	89
Anexo 16	Prueba de Kruskal-Wallis para los porcentajes promedio de ovocitos de alpaca en estadio de Mitosis I (MI) después de la maduración in vitro. Ayacucho, noviembre 2017	89
Anexo 17	Prueba de Kruskal-Wallis para los porcentajes promedio de embriones de alpaca segmentados, después del cultivo in vitro de embriones. Ayacucho, noviembre 2017	89
Anexo 18	Prueba de Kruskal-Wallis para los porcentajes promedio de mórulas de alpaca, después del cultivo in vitro de embriones. Ayacucho, noviembre 2017	89
Anexo 19	Prueba de Bonferroni para los porcentajes promedio de mórulas de alpaca, después del cultivo in vitro de embriones, a un nivel de confianza de 90%. Ayacucho, noviembre 2017	89
Anexo 20	Prueba de Kruskal-Wallis para los porcentajes promedio de blastocistos de alpaca, después del cultivo in vitro de embriones. Ayacucho, noviembre 2017	90

Anexo 21	Prueba de Bonferroni para los porcentajes promedio de blastocistos de alpaca, después del cultivo in vitro de embriones a un nivel de confianza de 95%. Ayacucho, noviembre 2017	90
Anexo 22	Prueba de Kruskal-Wallis para los porcentajes promedio de embriones de alpaca, después del cultivo in vitro. Ayacucho, noviembre 2017	91
Anexo 23	Prueba de Bonferroni para los porcentajes promedio de embriones de alpaca, después del cultivo in vitro a un nivel de confianza de 95%. Ayacucho, noviembre 2017	91
Anexo 24	Prueba de Kruskal-Wallis para los porcentajes promedio de embriones degenerados de alpaca, después del cultivo in vitro de embriones. Ayacucho, noviembre 2017	91
Anexo 25	Prueba de Bonferroni para los porcentajes promedio de embriones degenerados de alpaca, después del cultivo in vitro de embriones. Ayacucho, noviembre 2017	92
Anexo 26	Matriz de consistencia	93

RESUMEN

La escasa información existente sobre la producción *in vitro* de embriones de alpaca y considerando la maduración *in vitro* de ovocitos como una primera etapa fundamental que antecede a las demás etapas del proceso, sugiere estudiar y evaluar factores involucrados en ésta; por ello, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de dos Factores de Crecimiento (FC): Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) y Factor de Crecimiento Similar a la Insulina Tipo I (IGF-I) sobre la tasa de maduración de ovocitos de alpaca y evaluar la influencia de ésta sobre la tasa de desarrollo embrionario luego de la Fecundación *In Vitro* (FIV), además de determinar el tipo y concentración de FC con la que se obtiene la mayor cantidad de embriones. La investigación se ejecutó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán-INIA-Ayacucho. Se recuperaron un total de 2369 ovocitos de 414 ovarios de alpaca provenientes del Matadero Municipal de Huancavelica, los cuales fueron transportados a 4-9°C por un máximo de 20 h en Solución Salina al 0,9% con gentamicina. Para la recuperación de los Complejos Cúmulo-Ovocitos (CCO) se utilizó la técnica de disección-ruptura folicular, seleccionando los ovocitos de calidad I, II y III. Los ovocitos seleccionados fueron distribuidos al azar en un medio de maduración constituido por: TCM-199, piruvato de sodio (0,011 g/ml), 17- β estradiol (22,2 mg/ml), L-glutamina (0,015 g/ml), FSH (0,5 mg/ml), LH (0,5 mg/ml), SFB (5%), gentamicina (80 mg/ml) y suplementado con FC según tratamiento. Se diseñaron cinco tratamientos: T1: 10 ng/ml de IGF-I; T2: 50 ng/ml de IGF-I; T3: 10 ng/ml de EGF; T4: 50 ng/ml de EGF y T5: sin FC. Posteriormente el 30% de ovocitos sometidos a maduración *in vitro* fueron removidos de cada uno de los tratamientos para ser fijados en solución de metanol y ácido acético (3:1) a 4°C por 36 h y evaluados mediante la tinción de orceína acética (2%) para determinar la maduración nuclear a un aumento de 400X. El 70% de ovocitos sometidos a maduración se fecundaron con espermatozoides recuperados de epidídimos y los presuntos cigotos fueron cultivados en medio SOF durante 7 días a 38.5°C con CO₂ (5%), O₂ (5%), N₂ (5%) y 90% de humedad relativa. Los resultados indican que hay diferencia significativa ($P < 0,05$) de los FC sobre la tasa de maduración de ovocitos con la prueba de Duncan; resultando el T1 (61,81%) diferente al T5 (42,22%). Respecto a la tasa de desarrollo embrionario, también se encontró diferencia significativa ($P < 0,05$) entre tratamientos, siendo el IGF-I a 50ng/ml (37,26%) el tratamiento que proporcionó mayores tasas de desarrollo embrionario respecto a los demás tratamientos. En conclusión, la suplementación del medio de maduración con IGF-I a 50 ng/ml favorece la producción *in vitro* de mayor cantidad de embriones de alpaca.

Palabras claves: *Vicugna pacos* “alpaca”, maduración *in vitro* de ovocitos, embriones, factores de crecimiento, disección-ruptura folicular.

I. INTRODUCCIÓN

La crianza de Camélidos Sudamericanos en las zonas alto andinas del Perú, Bolivia, Argentina, Chile y Ecuador constituyen una actividad importante y de impacto en el desarrollo socio económico de la población, no sólo por su capacidad de adaptación a las condiciones medioambientales (3,000 a 5,000 msnm) donde no es posible realizar como actividad económica la agricultura ni la crianza de otras especies de animales domésticos, sino por su capacidad inusual de convertir eficientemente los pastos pobres de estas alturas en productos de alta calidad como la fibra y carne, además de servir para transporte, aportar estiércol como fertilizante, servir como fuente de ingresos económicos y cumplir roles relevantes en festividades rituales.¹

En la actualidad, en el Perú el 95% de la crianza de Camélidos Sudamericanos se desarrolla en condiciones de comunidades campesinas, si se tiene en cuenta que el 70% de los productores desarrollan la crianza bajo sistemas tradicionales; con escasos criterios de mejoramiento genético, debido a que cada vez existe una demanda insatisfecha de reproductores de calidad y la escasez de centros de producción de reproductores de probada calidad que conllevan a que la producción y productividad sean bajas, comprometiendo el peso del vellón, peso vivo y la calidad de la fibra. Por lo tanto, se hace imprescindible forjar y seguir trabajando en investigaciones y validaciones que apliquen las biotecnologías reproductivas apropiadas para contribuir a mejorar los niveles de producción y productividad, logrando la multiplicación de animales de alto valor genético.²

La aplicación de las biotecnologías reproductivas como la Fecundación *In Vitro* (FIV) representa una alternativa de gran trascendencia productiva para el mejoramiento genético de camélidos domésticos y para la preservación de los camélidos silvestres, mejorando rápidamente de esta manera los bajos índices reproductivos y logrando la multiplicación de animales de alto valor genético; así como viene contribuyendo al progreso genético en bovinos domésticos.³

Actualmente se vienen desarrollando diversas estrategias para poder incrementar la eficiencia de la producción *in vitro* de embriones en camélidos a través de la FIV, pero estas aún no están debidamente desarrolladas debido a que se requieren más investigaciones para perfeccionar los sistemas óptimos en la producción, evaluando el protocolo paso a paso.⁴

La producción *in vitro* de embriones involucra tres procesos fundamentales, que independientemente del protocolo que se utiliza, en orden cronológico son: maduración *in vitro* de ovocitos (MIV), FIV y cultivo *in vitro* de embriones (CIV); estas tres etapas comprenden diversos procesos fisiológicos y reacciones bioquímicas, condicionando cada uno el éxito o el fracaso del siguiente⁵⁻⁶ y la escasa información existente sobre la estandarización de protocolos de la FIV en camélidos domésticos sugiere, estudiar y evaluar factores involucrados en la maduración de ovocitos como primera etapa, con la finalidad de obtener una alta tasa de ovocitos maduros aptas para la FIV, así como se obtuvo en otras especies de interés.⁷

Por lo tanto, con la finalidad de desarrollar un protocolo de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca, los objetivos del presente trabajo fueron:

1.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de dos factores de crecimiento (FC): Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) y Factor de Crecimiento Insulínico tipo I (IGF-I) en diferentes concentraciones, sobre la tasa de maduración de ovocitos y posterior desarrollo embrionario *in vitro* de *Vicugna pacos* "alpaca".

1.2. Objetivos específicos

- Determinar el tipo y concentración de factores de crecimiento para lograr la mayor tasa de maduración de ovocitos y desarrollo embrionario *in vitro* de alpacas.
- Determinar la tasa de ovocitos maduros *in vitro* de alpacas, inducidas con factores de crecimiento.
- Determinar la tasa de desarrollo embrionario *in vitro* de alpacas a partir de ovocitos madurados con FC.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes.

Hasta la actualidad existen escasos reportes de investigaciones sobre la maduración *in vitro* de ovocitos de alpacas inducidas con factores de crecimiento; sin embargo, hay evidencias de investigaciones que han incorporado estos factores en sus protocolos de maduración *in vitro*; así como también, en el caso de llamas, bovinos, ovinos y otras especies de interés económico.

En el año 2008, se reportó por primera vez en el Perú, embriones de alpaca producidos *in vitro*; investigación en la que utilizaron ovarios colectados de un matadero, donde a partir de 31 ovarios, se recogió 262 Complejo Cúmulo-Ovocito (CCO) que se maduraron en Medio de Cultivo Tisular (TCM-199) suplementado con: EGF, Suero Fetal Bovino (SFB) inactivado con calor al 10%, Hormona Folículo Estimulante (FSH), Hormona Luteinizante (LH), estradiol y cisteamina. Los CCO se incubaron durante 30 h a 38,5°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad. Luego de la FIV y CIV, el porcentaje de ovocitos que alcanzó la etapa de mórula y blastocisto fue del 8,0% (21/262) y el porcentaje de blastocistos (día siete) fue de 14,28% (3/21).⁸

En el año 2007, una investigación realizada en llamas, reportó el uso de FC en el medio de maduración *in vitro* de ovocitos. Para esta investigación se recuperó en total 144 CCO de 156 folículos aspirados de 22 ovarios, recuperados mediante Laparatomía de Flanco y Aspiración de Ovocitos Guiada por Ultrasonido Transvaginal. Los CCO fueron madurados en un medio de maduración constituido por: TCM-199, 5 µg/ml de FSH, 10 µg/ml LH, 10 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de IGF-I, 1 µg/ml de 17β-estradiol y 10% de SFB, obteniendo 74% de ovocitos en metafase II luego de 30 h de maduración *in vitro*; así mismo, indican que una mayor cantidad de ovocitos recuperados por Laparatomía de Flanco alcanzó la etapa de metafase II (77% frente a 44%, P<0,005).⁹

En bovinos, en un experimento se evaluó el efecto de la adición de EGF en el medio de maduración de ovocitos en la producción *in vitro* de embriones, criopreservados mediante congelación lenta. Los CCO fueron colectados y clasificados dividiéndolos en tres grupos: Grupo I. Se realizó la adición de 100 ng/ml de EGF en el medio para la MIV. Grupo II. Adición de 50 ng/ml de EGF en el medio para MIV. Los CCO del tercer grupo (Control) fueron madurados en el mismo medio para MIV, pero sin la adición de EGF. Reportando que, al adicionar 50 ng/ml y 100 ng/ml de EGF al medio MIV, se logró incrementar el porcentaje de ovocitos en metafase II ($81,4 \pm 4,2$ y $86,3 \pm 4,9$; respectivamente) frente al grupo control ($75,3 \pm 4,3$); así mismo, reportan que tras la adición de 50 ng/ml de EGF al medio para la MIV se obtiene una mayor cantidad de embriones ($33,8 \pm 10,9$) frente al grupo I y grupo control ($30,9 \pm 15,9$ y $30,7 \pm 3,5$; respectivamente).¹⁰

Otro estudio en bovinos, investigó el efecto de EGF sobre la tasa de maduración de ovocitos cultivados *in vitro* en un medio de maduración químicamente definido; para el cual utilizaron 484 ovocitos de ovarios recolectados en matadero, siendo el medio base TCM-199 suplementado con piruvato de sodio, 17β -estradiol y gentamicina (medio control), donde se formaron cuatro tratamientos al azar: T1: Control sin EGF; T2: control más 1 ng/ml de EGF; T3: control más 10 ng/ml de EGF y T4: control más 50 ng/ml de EGF. Encontrándose mayor proporción de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II con el tratamiento de 50 ng/ml de EGF (73%), seguido por 10 ng/ml (54,2%) y con 1 ng/ml de EGF (32,3%).⁶

Así mismo, en otro estudio en bovinos se utilizó EGF en el medio de maduración *in vitro*; donde los CCO recuperados fueron seleccionados y madurados *in vitro* en 500 μ l de medio de maduración constituido por: TCM199, 10% de SFB, 10 ng/ml de EGF y antibióticos, recubiertos con aceite mineral. Después del periodo de incubación (22-24 h a una temperatura de $38,5^{\circ}\text{C}$ al 5% de CO_2), se obtuvo una media de 87% de ovocitos que alcanzaron la maduración nuclear (metafase II).¹¹

Por otro lado, otro estudio evaluó el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos a partir de CCO madurados en TCM-199 suplementado con LH, FSH, 17β -estradiol y cisteamina. Este medio de maduración se enriqueció con SFB (10%) o con mezclas de FC: EGF, IGF, Factor de crecimiento de Fibroblastos (FGF) y Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF). Reportando que, al adicionar 10ng/ml de EGF y 20 ng/ml de FGF al medio para la MIV, se obtuvo $50,17 \pm 1,60\%$ de embriones con cinco a ocho células, obtenidos al día tres. Además, reportan que al adicionar 10 ng/ml de EGF y 5ng/ml de IGF-I, se obtienen $16,51 \pm 1,49\%$ de

blastocistos, al día siete.¹²

También, otro estudio reveló que tras la adición de EGF (10 ng/ml) e IGF-I (5 ng/ml) al medio de maduración (TCM-199, NaHCO₃, FSH, LH, 17 β -estradiol y cisteamina), se obtuvieron valores más elevados en el porcentaje de embriones de cinco a ocho células (52,22 $\pm$ 1,74% y 46,82 $\pm$ 1,17%, respectivamente), respecto al grupo control (41,03 $\pm$ 1,75%); así mismo, revelan que al evaluar al sexto día la cantidad de mórulas y blastocistos fue de 34,77 $\pm$ 1,64% para EGF (10 ng/ml), 36,37 $\pm$ 1,19% para IGF-I (5 ng/ml) y 32,58 $\pm$ 1,49% para el grupo control.¹³

En otra investigación se buscó estudiar el efecto del EGF en la MIV de ovocitos bovinos sobre el desarrollo embrionario *in vitro*. Se probaron los siguientes tratamientos: 1) Medio de maduración ovocitaria modificado (MMOM) constituido por: TCM-199, alcohol polivinílico, hepes, piruvato de sodio, gentamicina, cisteamina, L-cisteína, L-glutamina, bicarbonato de sodio, FSH e IGF-I (5 ng/ml) (T1); 2) MMOM suplementado con 10 ng/ml de EGF (T2); 3) MMOM suplementado con SFB al 10% (T3). Luego de la MIV, los ovocitos fueron fecundados y cultivados *in vitro* hasta el estadio de blastocisto. Encontrando que, los ovocitos madurados con 10 ng/ml de EGF presentaron una tasa mayor de desarrollo hasta el estadio de blastocisto (24,4%) respecto al medio control (10,5%).¹⁴

Así mismo, se han madurado con éxito ovocitos de cerda al suplementar el medio con 25 ng/ml EGF, incrementando de manera significativa el grado de expansión de las células del cúmulo durante la maduración, y que concentraciones de 50 - 100 ng/ml también incrementan el grado de expansión; además, se observa que disminuyeron el número de ovocitos degenerados.¹⁵

Por otro lado, se realizaron estudios en bovinos, donde la adición de 10 ng/ml de IGF-I al TCM-199 como medio de maduración que contenía 10% de suero de vaca en estro, tuvo un efecto positivo sobre la tasa de división. Sin embargo, la tasa de división solo fue un efecto temporal, y no presentó un efecto significativo en el número de blastómeros, de manera similar la suplementación del medio de cultivo con concentraciones de 50 y 100 ng/ml de IGF-I no afectó el desarrollo temprano del embrión.¹⁶

Otro trabajo de investigación en equinos y bovinos, buscó establecer que el EGF es un regulador de la maduración de los ovocitos mediante un mecanismo en el que están implicadas enzimas tirosina-quinasa y la presencia del receptor de EGF en los folículos ováricos mediante técnicas inmunocitoquímicas. Para el estudio, se seleccionan ovocitos ovinos y equinos tras la aspiración de los

contenidos foliculares y se cultivan para su maduración *in vitro*, en TCM 199 durante 22 h (ovinos) o 36 h (equinos), en presencia de EGF o de tirfostinas A-23 y A-47, dos inhibidores selectivos de la actividad tirosina-quinasa (TKIs). Reportando que, los ovocitos cultivados en presencia de EGF presentan mayor porcentaje de maduración que los controles y que la presencia de TKIs en los medios con EGF da lugar a tasa de maduración similar a las de los controles.¹⁷

2.2. Fisiología ovárica

2.2.1. Ovogénesis

Los ovocitos se forman a partir de un pequeño número de células germinales primordiales, que tienen su origen en regiones extragonadales, y que se han detectado en el endodermo del saco vitelino y en la región del alantoides. Durante el desarrollo fetal las células germinales primordiales del ovario van a sufrir un proceso de diferenciación; e inician un proceso migratorio hacia las gónadas incipientes del feto y cuando éstas se sitúan en el ovario, reciben el nombre de ovogonias. Este proceso migratorio se encuentra dirigido por factores quimiotáxicos, como el Factor de crecimiento transformante β (TGF β). Otras señales, como el c-Kit y el EGF, desempeñan un papel importante en la supervivencia y división de las células germinales durante este proceso migratorio; así como en su posterior desarrollo y crecimiento.¹⁸⁻²⁰

Las ovogonias, se multiplican por mitosis hasta la última generación, dando lugar a ovocitos primarios al iniciarse la primera división meiótica. Toda la población de ovocitos entra en la meiosis sincrónicamente en la vida fetal, justo antes o poco después del nacimiento se produce la primera detención de la meiosis en el estadio de diploteno de profase I (estadio dictiatio); en este momento el ovocito es rodeado por células pre-granulosas (folículos primordiales) que forman una membrana basal alrededor de las mismas, generando el comportamiento folicular.²¹ De esta manera, el núcleo del ovocito primario entra en la etapa de descanso de la primera profase meiótica. El cual termina con la maduración folicular en el estado preovulatorio, el fin del estado de reposo depende en gran medida de la LH.²² Además, 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 Adenosín Monofosfato cíclico (AMPc), la hipoxantina y el factor inhibidor de la maduración de ovocitos, cuya finalidad es mantener inactivo al Factor Promotor de la Maduración/meiosis (MPF).²³⁻²⁴

2.2.2. Foliculogénesis

La foliculogénesis es el proceso de formación, crecimiento y diferenciación folicular que abarca desde el estadio de folículo primordial hasta el de folículo pre-ovulatorio.²⁵

La formación de folículos primordiales, se lleva a cabo durante la vida fetal iniciando con un ovocito incompletamente rodeado de células planas, llamadas células pre-granulosa, cuyo desarrollo requiere de la habilidad de los ovocitos para separarse de los “nidos de células germinales” y asociarse a una capa de células precursoras de granulosa, donde la transformación de folículo primordial a folículo primario puede prolongarse.²² Cuando se alcanza esta etapa de folículo primario, las células pre-granulosas no ejercen ningún efecto inhibitor sobre el crecimiento del ovocito pero sí sobre la meiosis, por lo que en esta etapa empiezan las mitosis de éstas células y al mismo tiempo el ovocito aumenta de tamaño. De este modo, el folículo primario se transforma en folículo preantral multilaminar (folículo secundario) que implica la transformación de células pre-granulosas que forman un epitelio estratificado alrededor del ovocito, llamándose células de la granulosa. Estas células de la granulosa alcanzan un número elevado como respuesta a la FSH y se forman cavidades en el espacio extracelular llenas de un fluido denominado fluido folicular; a medida que la cantidad de líquido folicular aumenta, las cavidades que ocupan también aumentan de tamaño para formar el antro. La formación del antro, dentro de una granulosa de varias capas, es característico de folículos antrales (folículo terciario), y durante el desarrollo del folículo, la producción de líquido antral se intensifica por el aumento de la vascularización folicular y la permeabilidad de los vasos sanguíneos; lo que es, junto con un enorme aumento en el tamaño de los folículos antrales.²⁶

Luego de estos procesos, las células de la granulosa se diferencian en dos subpoblaciones: por una parte, las células de la granulosa que revisten la pared del folículo y forman un epitelio estratificado en contacto con la lámina basal; y por otra, las células del cúmulo-ovocito que forman varias capas de células cilíndricas alrededor del ovocito. Por último, en respuesta a la estimulación hormonal, dos eventos importantes se producen en el complejo celular ovocito-cúmulo; primero, los ovocitos al completar su crecimiento completan la primera división meiótica y se detienen en metafase II; segundo, las células de la granulosa del cúmulo que rodean a las células germinales (ovocitos) se someten a expansión, que consiste en la deposición de una matriz extracelular rica en ácido hialurónico que hace que

las células se separen. El ovocito en metafase II, aún encerrado por las células del cúmulo expandido, es ovulado en el oviducto listo para la fertilización.¹⁹ Además, el folículo dominante se encuentra bien vascularizado y genera niveles superiores de factores como el IGF-I que favorece la supervivencia y división de las células de la granulosa.²⁷

2.2.3. Ovocito

El ovocito es una célula única y grande, se encuentra rodeado de varias capas de células que constituyen el *cúmulus oophorus* (células del cúmulo-ovocito).²⁸ Las células de la granulosa que se encuentran en la parte más interna de la capa de células se denominan corona radiada, ésta se comunica con el ovocito a través de uniones intercelulares conocidas con el término anglosajón de “gap”.²⁹ La presencia de estas uniones gap juegan un rol importante en 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.³⁰⁻³²

Por otro lado, las cubiertas ovocitarias representan una peculiaridad de los ovocitos, siendo la cubierta principal la zona pelúcida (ZP), una capa adyacente a la membrana plasmática,³³ la cual es una especialización de la matriz extracelular de ocho a diez micrómetros de espesor formada fundamentalmente por glicoproteínas, algunas de las cuales son secretadas por el óvulo y otras por las células granulares.³⁴ Su importancia 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.³⁵

2.3. Maduración del ovocito

La maduración del ovocito es un proceso durante el cual los ovocitos adquieren la capacidad intrínseca para soportar etapas posteriores de desarrollo de forma escalonada, alcanzando finalmente la activación del genoma embrionario.³⁶ Este proceso comprende eventos distintos y complejos que van desde la reanudación de la meiosis de la profase I (primer bloqueo meiótico) hasta la maduración nuclear del ovocito en metafase II, donde tiene lugar el segundo bloqueo meiótico. La

maduración se puede dividir en dos procesos separados: la maduración nuclear y la maduración citoplasmática, aunque ambos procesos ocurren simultáneamente y en forma interconectada.³⁷

La reanudación de la meiosis se inicia con una oleada pre-ovulatoria de LH y sólo se produce cuando los ovocitos de los folículos dominantes (pre-ovulatorios) tienen un crecimiento completo y meióticamente competentes. Antes, y en el momento de la oleada de LH, el ovocito está rodeado por un cúmulo compacto. A partir de las células más internas de los cúmulos, numerosas proyecciones penetran a la Zona Pelúcida (ZP) que finalizan en el oolema con uniones gap. Poco después de la oleada de LH, se da la interrupción de estas uniones y durante el período comprendido entre la oleada de LH y la ovulación, el ovocito sufre una serie de cambios notables no sólo en su núcleo, sino también en su citoplasma, logrando su estado maduro.²⁶

2.3.1. Maduración nuclear

Cuando la meiosis se reinicia después de un pico preovulatorio de LH y entra en la etapa de diacinesis, los cromosomas vuelven a condensarse, el número de quiasmas disminuye y los cromosomas homólogos quedan unidos solo por sus extremos. Al término de la profase I se produce la ruptura de la envoltura nuclear, también conocida como ruptura de la vesícula germinal (VG) y los microtúbulos del huso se unen a los cinetocoros. En la metafase I (MI), los cromosomas homólogos se hallan dispuestos en el plano ecuatorial, unidos entre sí por los extremos, mientras que son traccionados hacia los polos opuestos por los centrómeros. En anafase I los cromosomas homólogos se separan dirigiéndose a los respectivos polos. Una vez que llegan a los polos; en la telofase I, uno de los grupos de cromosomas homólogos es expulsado del ovocito como corpúsculo polar; mientras que, el otro grupo continúa con la segunda división meiótica. Al llegar al estadio de metafase II (MII), los cromosomas se encuentran dispuestos en el plano ecuatorial con cada cromátida hermana unida por el centrómero a polos opuestos del huso. En este punto la meiosis se arresta nuevamente (segundo bloqueo meiótico) y se reiniciará cuando el ovocito sea fecundado por un espermatozoide. La entrada de un espermatozoide en el citoplasma del ovocito maduro induce el segundo reinicio de la meiosis. Durante la anafase II los grupos de cromátidas hermanas se dirigen hacia los polos opuestos y durante la telofase II uno de los grupos es expulsado como el segundo corpúsculo polar. A continuación, los cromosomas del ovocito y los del espermatozoide se

descondensan y forman los pronúcleos femenino y masculino respectivamente. A medida que se acercan ambos pronúcleos atraviesan una fase de síntesis de ADN para replicar las cromátidas. Finalmente establecen un contacto íntimo entre sí, pierden las envolturas nucleares y los cromosomas maternos y paternos se disponen en el huso conformando una sola metafase mitótica. Esta primera mitosis resulta en la formación de las dos primeras células del nuevo embrión.³⁸

2.3.1.1. Evaluación del estadio nuclear de los ovocitos

Los ovocitos se evalúan de acuerdo al progreso meiótico en las que se encuentran, de acuerdo a los siguientes criterios:³⁹

- **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 (MI):** Los cromosomas se encuentran condensados e individualizados al máximo, generalmente agrupados en masa y aglutinados en la zona ecuatorial del ovocito.
- **Anafase I (AI):** Ocurre cuando los cromosomas, que se encuentran bajo división o segregación, se disponen a lo largo del huso acromático.
- **Telofase I (TI):** 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 (MII):** 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.
- **Degenerados:** 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.

2.3.2. Maduración citoplasmática

La maduración citoplasmática comprende los procesos o mecanismos

moleculares que acompañan a la maduración nuclear y preparan al ovocito, los cuales involucran la redistribución de las organelos citoplasmáticas, los cambios en la dinámica de los filamentos del citoesqueleto y la maduración molecular.^{36, 38}

2.3.2.1. Redistribución de los organelos citoplasmáticos

Durante la maduración, las mitocondrias sintetizan ATP necesario para la síntesis de proteínas que a su vez apoya en la finalización de los procesos posterior de maduración. Además, un estudio ultra estructural ha demostrado que, la posición de las mitocondrias cambia desde una localización periférica a una distribución dispersa en todo el citoplasma. Por otro lado, la cantidad de ribosomas aumenta a partir del inicio de la maduración, observándose también un aumento de la síntesis de proteínas.

En el estadio de GV el retículo endoplásmico se encuentra uniformemente distribuido en el citoplasma, pero al final de la maduración se localiza en la zona cortical, aumentando también su sensibilidad para la liberación de Ca^{2+} que ocurre durante la fecundación y que induce el comienzo del desarrollo embrionario. Los gránulos corticales son organelos derivadas del aparato de golgi que están presentes solamente en ovocitos. En los ovocitos inmaduros están distribuidos en el citoplasma pero durante la maduración se relocalizan en la zona cortical muy próximos a la membrana celular. En respuesta a la entrada de un espermatozoide al citoplasma, el retículo endoplásmico libera Ca^{2+} que lleva a la exocitosis de los gránulos corticales, lo que induce cambios en la zona pelúcida que previenen la polispermia.

2.3.2.2. Dinámica de los filamentos del citoesqueleto

Los filamentos que componen el citoesqueleto son los microtúbulos: los filamentos de actina y los filamentos intermedios, son los responsables de la segregación de los cromosomas durante la meiosis, de la división celular durante la citocinesis y del movimiento y transporte de moléculas y organelos dentro de la célula. Los microtúbulos cumplen un papel fundamental durante la meiosis ya que son los componentes principales del huso meiótico encargado de alinear y segregar correctamente los cromosomas homólogos en la anafase I y las cromátidas hermanas en la anafase II.

2.3.2.3. Maduración molecular

La maduración molecular ocurre durante el crecimiento y maduración del ovocito y se refiere a la transcripción, almacenamiento y procesamiento del ARN mensajero que va a ser traducido en proteínas por los ribosomas. Estas proteínas

estarán involucradas tanto en la maduración del ovocito como en los eventos subsiguientes como la fecundación, la formación de pronúcleos y el desarrollo embrionario temprano. Después del reinicio de la meiosis no hay expresión génica por lo que todo el ARN mensajero debe ser almacenado antes del inicio de la maduración. De gran importancia es el almacenamiento de ARN mensajero de las proteínas reguladoras del ciclo celular como el Factor Promotor de Maduración (MPF), MOS y MAPK. La síntesis de estas proteínas en las primeras horas de la maduración precede el reinicio de la meiosis. MPF es un heterodímero compuesto por la subunidad reguladora ciclina B1 y la subunidad catalítica p34cdc2. MOS activa la cascada de MAPK la cual modula la actividad de MPF que lleva al reinicio de la meiosis.²⁶ El glutatión es otra proteína sintetizada y acumulada durante la maduración y tiene un papel importante en la protección contra el estrés oxidativo y también está relacionada a la descondensación de la cabeza del espermatozoide y la formación del pronúcleo masculino. La acumulación de glutatión durante la maduración está relacionada también a la presencia de las células del cúmulo.

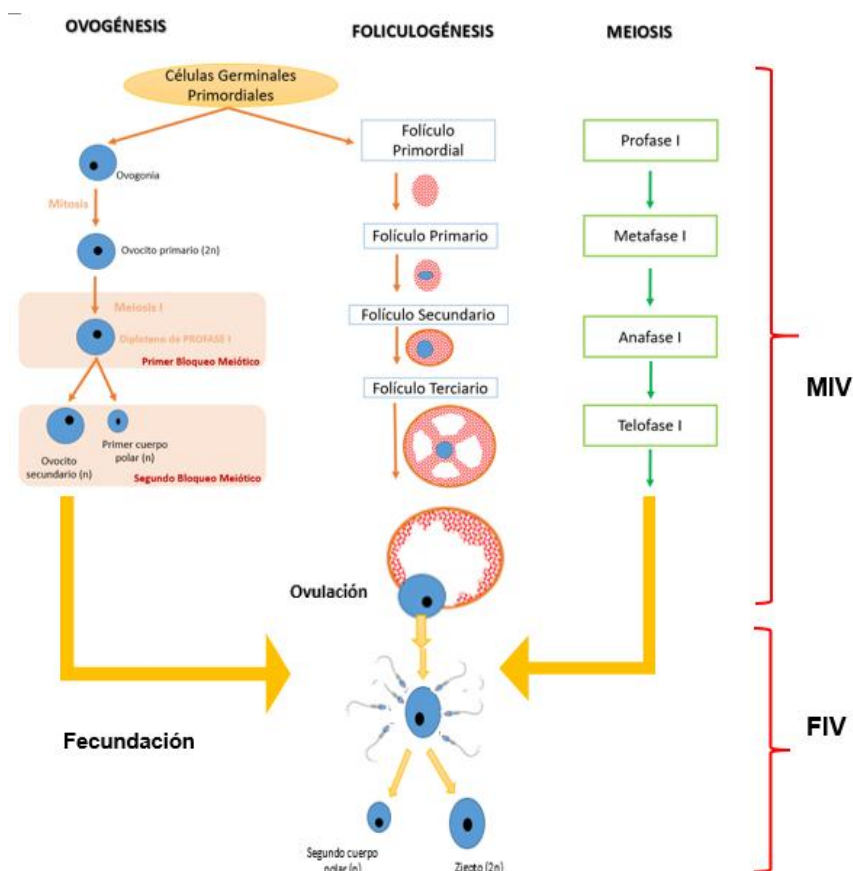


Figura 1. Relación entre ovogénesis, foliculogénesis y meiosis.

Fuente: Elaboración propia.

2.4. Factores de crecimiento

Los FC como tal son moléculas de naturaleza proteica, también llamados péptidos biorreguladores, que, al contrario de las hormonas reproductivas conocidas, son sintetizados por varios órganos y tejidos. Particularmente cumplen funciones endocrinas y autocrinas, siendo su principal función el control del ciclo celular, regulando el desarrollo de las distintas etapas de éste; además de ser considerados mitogénicos. Actualmente se han identificado y caracterizado un gran número de factores de crecimiento, a partir de la experimentación con células eucarióticas mantenidas en cultivo, entre los que se pueden mencionar:⁴⁰⁻⁴¹

- Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)
- Factor de Crecimiento Insulínico tipo I (IGF-I)
- Factor de Crecimiento Insulínico tipo II (IGF-II)
- Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF)
- Factor de Crecimiento Transformante (TGF)
- Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF)
- Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF)
- Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)
- Factor de Crecimiento Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF)

Siendo IGF, EGF, TGF y PDGF los factores de crecimiento más conocidos y estudiados en los programas experimentales de producción *in vitro* de embriones. Estos han sido estudiados, con el objetivo de emplearlos para mejorar los medios utilizados en el cultivo *in vitro* de embriones y también para aumentar la eficacia en la maduración de los ovocitos.⁴¹

Su efecto biológico es ejercido por la interacción con los receptores de membrana, que usualmente son glicoproteínas, las cuales se comunican por cambios conformacionales con el llamado Sistema de Segundo Mensajero. La respuesta a los FC es una estimulación rápida al transporte de aminoácidos, utilización y consumo de glucosa, ARN y síntesis de proteínas, algunos inducen síntesis de ADN y replicación celular.⁴² La fusión con moléculas receptoras ubicadas en la membrana plasmática de las células blanco generan señales, las cuales son transmitidas posteriormente hacia el interior del citoplasma mediante la activación de enzimas con actividad kinásica que fosforilan ciertos sustratos proteicos constituyendo de este modo, una cascada de señales conocida como transducción que finaliza activando la expresión génica y produciendo la transcripción específica de ciertos genes los que serán traducidos en los

ribosomas, constituyéndose en la respuesta celular a un determinado factor de crecimiento.⁴³

2.4.1. Factor de Crecimiento Epidermal (EGF)

Este factor de crecimiento es un polipéptido compuesto por una cadena de 53 residuos de aminoácidos,⁴³ que presenta en su estructura tridimensional tres puentes disulfuro intramoleculares gracias a seis residuos de cisteína (Figura 2); estos puentes disulfuro son fundamentales para el efecto y la afinidad sobre su receptor de membrana.⁴⁴

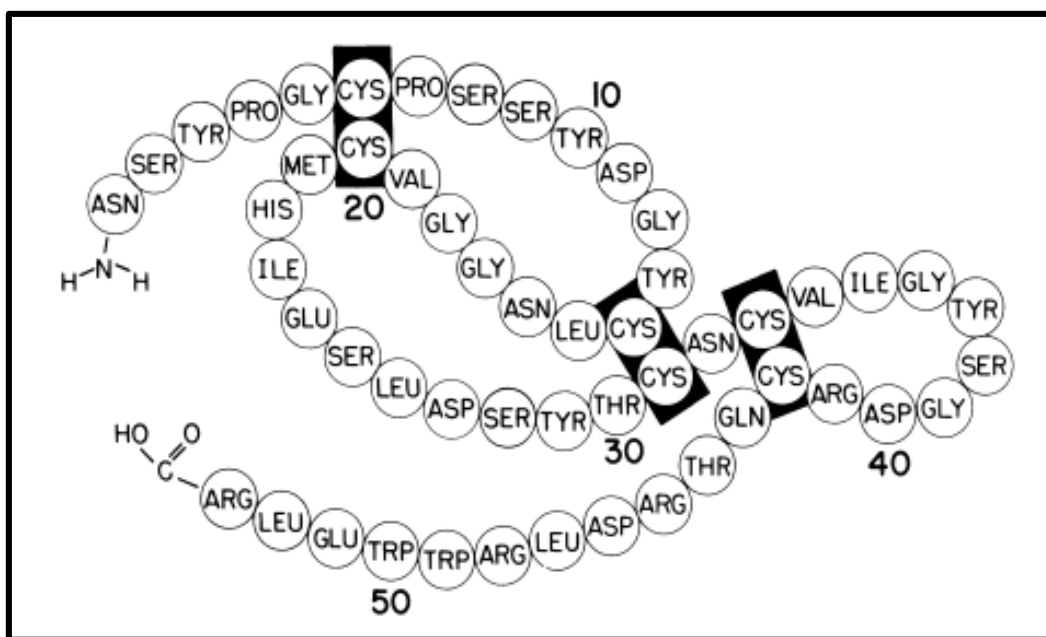


Figura 2. Secuencia de aminoácidos y ubicación de los enlaces disulfuro del EGF de ratón.⁴⁴

El EGF estimula la proliferación de células epidérmicas y epiteliales en animales y en una variedad de células en diferentes cultivos celulares. Su efecto biológico en las células diana está mediada por la unión y activación de un receptor específico llamado receptor de EGF de 170 kDa localizado en la membrana plasmática.⁴⁵ La unión de EGF al receptor induce la activación de la proteína tirosina quinasa, la cual conduce a la auto-fosforilación y fosforilación de diversos tipos de sustratos celulares.⁴⁵⁻⁴⁶ La autofosforilación es esencial para la interacción del receptor con sus sustratos. Estos se unen al receptor mediante los denominados dominios SH2. Las vías de transducción de señales activadas por EGF incluyen la vía de fosfatidilinositol, que conduce a la activación de la proteína quinasa C y a un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y la activación de Ras (proteína de unión al GTP) de la ruta Ras / Raf / MAP quinasa, que conduce

a la fosforilación de proteínas reguladoras y factores de transcripción y que culmina en la proliferación celular.⁴⁷⁻⁴⁸ Como receptor de factor de crecimiento, el receptor de EGF es único porque es específicamente reconocido y activado por tres factores de crecimiento distintos codificados por genes separados (EGF, TGF- α y VEGF). Estos factores de crecimiento tienen estructuras de esqueleto de disulfuro similares, pero su secuencia global es sólo 24% idéntica.⁴⁶

Se ha demostrado que el factor de crecimiento epidérmico tiene un efecto positivo durante la MIV y se ha encontrado estos en fluidos foliculares a niveles capaces de estimular la meiosis en una variedad de especies. Además, se ha detectado por inmunohistoquímica el receptor para el EGF (EGF-R) en el oviducto, en el útero y en el ovario y que la activación del EGF-R es indispensable para la maduración nuclear y la fecundación. El EGF activa la ruta de las Proteínas Quinasas activadas por Mitógenos (MAPK), implicadas en el reinicio de la meiosis y por lo tanto de la maduración nuclear del ovocito.⁴⁹

Para determinar la especificidad de la acción del EGF en la maduración del complejo de células cúmulo de ovocitos *in vitro* se realizaron diferentes experimentos, así como ver la acción de diferentes factores de crecimiento sobre la maduración de ovocitos de ratones; donde los ovocitos respondieron con una alta frecuencia de maduración al tratamiento realizado con EGF en comparación con otros factores y aumentando en un 51% con respecto a los controles, llegando a la conclusiones de que existe una especificidad para las moléculas de tipo EGF en la maduración del ovocito.⁵⁰

2.4.2. Factor de Crecimiento Similar a la Insulina tipo I (IGF-I)

Los IGFs son polipéptidos aislados de suero, cercanamente emparentados y que comparten un 62% de la secuencia de aminoácidos con un peso molecular bajo, de aproximadamente 7 KDa. Específicamente, el IGF-I es un polipéptido monocatenario de 70 residuos de aminoácidos unidos por tres puentes disulfuro. El IGF-I muestra una homología obvia con la proinsulina: las posiciones 1 a 29 son homólogas a la cadena B de la insulina y las posiciones 42 a 62 a la cadena A de la insulina. Un péptido de "conexión" acortado con 12 residuos (posiciones 30 a 41) en comparación con 30 a 35 en la proinsulina no muestra homología con el péptido de proinsulina C. Una secuencia de octapéptidos en el extremo COOH-terminal también es una característica que no se encuentra en la proinsulina.⁵¹ (Figura 3).⁵²

La familia de los factores de crecimiento insulínico, se componen de dos tipos: el

factor de crecimiento similar a la insulina tipo I y tipo II (IGF-I e IGF-II respectivamente). Los miembros de esta familia se relacionan por la secuencia y tiene efectos metabólicos similares a los que presenta la insulina.⁵³ Su actividad de multiplicación estimulante difiere en solo 5 residuos de aminoácidos del factor de crecimiento similar a la insulina tipo II; además, la somatomedina-C (Sm-C) y factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) son péptidos idénticos.⁵²

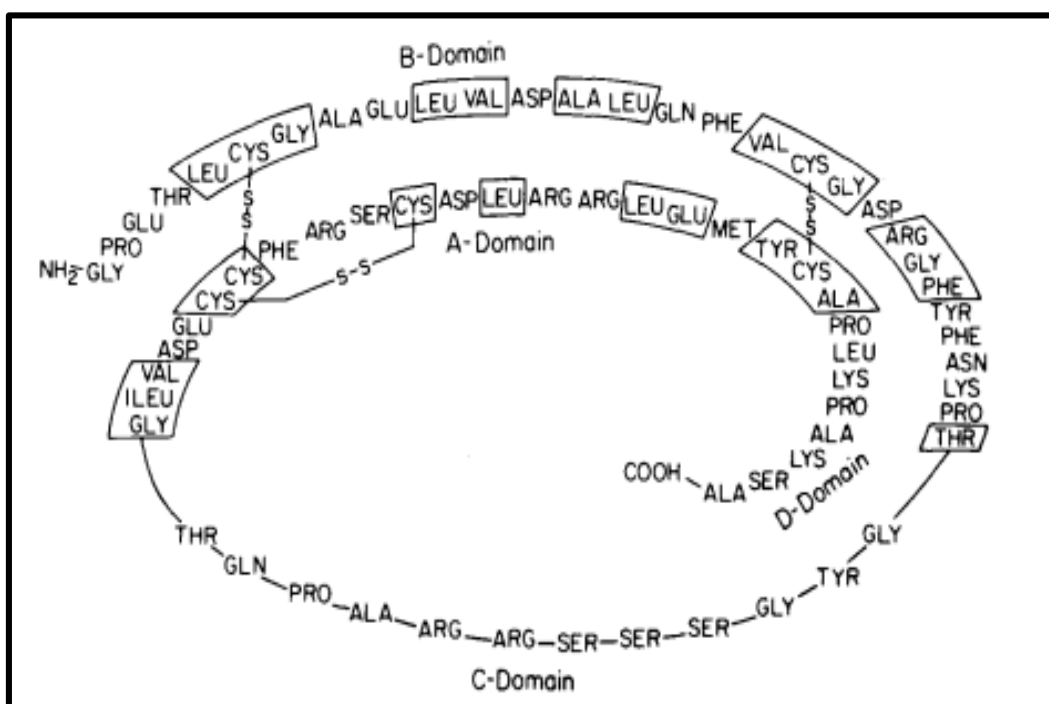


Figura 3. Secuencia de aminoácidos de Somatomedina-C / IGF-I. Las cajas indican aminoácidos idénticos a la proinsulina humana.⁵²

Las acciones de los IGF I e IGF II contribuyen a la regulación celular y estimulan la síntesis de proteínas a través de su activación de receptores de superficie celular específicos, principalmente el receptor de IGF-I, que son homólogos a los receptores de insulina y activan las cascadas de fosforilación. La estabilidad de los IGF y su interacción con sus receptores están mediados por proteínas de unión a IGF específicas (IGF-BP) que se encuentran en la circulación y en los fluidos extracelulares.⁵⁴⁻⁵⁵

Las acciones biológicas de los IGF no se limitan a la mitogénesis. También pueden inducir la diferenciación o promover la expresión de funciones diferenciadas. La respuesta biológica precisa está determinada por el estado de desarrollo de la célula, así como por la presencia de otras hormonas y factores de crecimiento.⁵³ El IGF-I está involucrado en la regulación del desarrollo folicular ovárico y se comporta en el ovario como un amplificador natural de las acciones ejercidas por

la FSH⁵⁶⁻⁵⁷ y que la producción y acción del IGF-I está estimulada por la presencia de hormonas gonadotrópicas y ováricas.⁵⁸

Un estudio ha demostrado que el IGF-I tiene un efecto positivo sobre la maduración de ovocitos porcinos *in vitro* y sobre el desarrollo embrionario previo a la implantación, lo que sugiere un papel fisiológico para IGF-I *in vivo*. El efecto *in vivo* de IGF-I puede ser indirecto a través de la estimulación autocrina de cúmulos o células de la granulosa dando como resultado una maduración mejorada de los ovocitos y la fertilización. Los resultados mostraron que la velocidad de escisión de los ovocitos se estimulaba notablemente de una manera dependiente de la dosis mediante la adición de IGF-I al medio de maduración del ovocito y que el desarrollo de embriones más allá de la etapa de ocho células se mejoró mediante la adición del IGF-I, alcanzando un máximo de 22% a 200 ng/ml de IGF-I.⁵⁹ Así mismo, otro estudio señala que la adición de IGF-I junto a gonadotropinas en el medio de maduración de ovocitos bovinos, favorece la maduración *in vitro* de ovocitos y el posterior desarrollo embrionario, incrementando el número de mórulas y blastocistos.⁶⁰

2.5. Producción *in vitro* de embriones

La producción *in vitro* de embriones representa una biotecnología de gran trascendencia productiva para el mejoramiento genético de animales élite como también para preservar especies de interés, es una alternativa que utilizando de por medio la técnica de FIV se busca obtener altas tasas de embriones.

Esta biotecnología demanda una gran cantidad de ovocitos capaces de ser fertilizados en laboratorio (FIV) y seguir su desarrollo hasta las primeras etapas del desarrollo embrionario, los cuales se pueden obtener a partir de ovarios provenientes de mataderos o de animales vivos. Los primeros trabajos de investigación en fecundación *in vitro* en Camélidos Sudamericanos se han realizado utilizando gametos recuperados de animales faenados. Estos trabajos han sido de valiosa ayuda para intentar estandarizar protocolos de MIV y FIV. Sin embargo aún no se ha determinado el tiempo de maduración *in vitro* de ovocitos de alpacas y llamas, los últimos trabajos de investigación apuntan a que se requieren alrededor de 40 h para obtener altas tasas de ovocitos en metafase II. Se han realizado diversos trabajos de fecundación *in vitro* de ovocitos de alpacas y llamas; pese a ello, aún no existe un protocolo definido que permitan obtener altas tasas de segmentación y blastocistos; sin embargo, ya se han reportado gestaciones en alpacas y llamas y el nacimiento de una llama la primera cría por

fecundación *in vitro*.^{3, 61}

La producción *in vitro* de embriones involucra tres etapas fundamentales, que independientemente del protocolo que se utiliza, en orden cronológico son:⁶¹

- Maduración *In Vitro* de ovocitos (MIV)
- Fecundación *In Vitro* de los ovocitos madurados (FIV)
- Cultivo *In Vitro* de los embriones (CIV)

2.5.1. Obtención de ovarios

Los ovarios se obtienen de alpacas sacrificadas en matadero. Muchos autores se muestran de acuerdo en que su obtención debe realizarse inmediatamente después de la muerte del animal, siendo frecuente el realizarlo dentro de los 30 minutos siguientes al faenado.^{8, 62} El transporte se hace en Solución Salina Fisiológica (SSF) o Buffer Fosfato Salino (PBS) con antibióticos.⁶³⁻⁶⁷

Por otro lado, el tiempo que transcurre (tiempo de transporte) desde la colecta de los ovarios hasta el cultivo de los ovocitos, debe oscilar entre 2 y 5 h; sin embargo, indican que después de 8 h 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.⁶⁸ Se han realizado otros estudios sobre el efecto de la temperatura y de transporte de ovarios de alpacas, que demuestran que los ovarios que se transportaron con una temperatura de 22°C, permiten mantener la calidad morfológica de los ovocitos y obtener una mayor tasa de maduración y división post fecundación *in vitro*.^{65, 67}

2.5.2. Recuperación de Complejos Cúmulo-Ovocito (CCO)

Se han probado tres metodologías de recuperación de CCO en Camélidos Sudamericanos a partir de ovarios colectados de animales beneficiados en camal, sobre la calidad de ovocitos y su posterior desarrollo *in vitro*, estos métodos son: Aspiración folicular, *slicing* folicular y disección-ruptura folicular.^{66, 69} Siendo el método más común para recoger ovocitos de ovarios procedentes del camal, 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.^{5, 8, 62-63, 70-71} Otros autores han recuperado ovocitos mediante *slicing* folicular o corte.⁶⁶⁻⁶⁷ Sin embargo, en un estudio se ha reportado que la mayor cantidad de ovocitos se recupera utilizando el método de disección-ruptura folicular, obteniendo la mayor cantidad de ovocitos aptos para la MIV que con aspiración y *slicing* folicular.⁶⁹ Por otro lado, la obtención de gametos provenientes de animales vivos ofrece la posibilidad de producir embriones de

animales genéticamente superiores. La técnica con mayor porcentaje de recuperación de ovocitos en Camélidos Sudamericanos es la aspiración de folículos vía laparotomía. Otra técnica es la punción vía transvaginal con guía ultrasonográfica pero el porcentaje de CCO recuperados varía entre 52%, 74% y 77% en hembras superestimuladas.⁷²

2.5.3. Selección y clasificación de ovocitos

Los estudios sobre la morfología del ovocito ofrecen datos sobre su capacidad de iniciar la meiosis y para madurar *in vitro* y debido a que no se pueden realizar técnicas que destruirían la célula, se debe establecer criterios exclusivamente morfológicos, para seleccionar los ovocitos que respondan a las distintas etapas a las que será sometido *in vitro*.^{71, 73} La selección se efectúa siguiendo dos criterios: primero, el aspecto citoplasmático, donde los ovocitos deben de presentar un ooplasma oscuro los cuales indican la 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; segundo, 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.⁷⁴⁻⁷⁵

En base a los criterios anteriormente mencionados (compactación del cúmulo y su aspecto citoplasmático) los ovocitos se clasifican en:^{63, 76}

- **Calidad I:** CCO con cúmulos de capas múltiples (>5 capas), compacto, claro y transparente; citoplasma con granulación fina y homogéneo.
- **Calidad II:** CCO 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 I.
- **Calidad III:** CCO con cúmulo ≤ 1 capa de granulosa o en partes desnudo.
- **Calidad IV:** Incluye a los ovocitos con cúmulo expandido, parcialmente desnudos o totalmente desnudos; citoplasma granular.

2.5.4. Maduración *In Vitro* de ovocitos (MIV)

In vitro, la maduración de ovocitos, se ha venido desarrollando como una técnica muy utilizada en los últimos años para obtener ovocitos aptos para la posterior fecundación *in vitro* y lograr así un embrión viable.⁷⁷ Esta técnica permite obtener

ovocitos maduros sin la necesidad de recurrir a la estimulación ovárica con gonadotrofinas y abarca desde la extracción de los CCO de los folículos antrales y su posterior cultivo hasta que alcanzan la metafase II. Los CCO recuperados a partir de ovarios colectados en camal requieren de un proceso de maduración artificial en el laboratorio, antes de utilizarlos en la producción *in vitro* de embriones. La maduración *in vitro*, simula el tiempo transcurrido y sobretodo los procesos metabólicos que en forma natural ocurren en el ovocito contenido en el folículo dominante, entre el pico preovulatorio de LH hasta que se produce la ovulación.⁷⁰ Así mismo, la MIV requiere de un ambiente óptimo que reúna todas las condiciones en las que un ovocito requiera para madurar *in vivo*; estas condiciones están establecidas por condiciones medioambientales y los medios de cultivo empleados en la maduración de ovocitos, además de la suplementación con hormonas, proteínas, FC, etc.

Si las condiciones de cultivo utilizadas durante esta etapa resultan ser desfavorables, se altera la maduración nuclear como la citoplásmica, lo que se refleja en que no se lleve a cabo la fecundación. Sin embargo, cuando el sistema empleado tiene pequeñas deficiencias sus efectos no se manifiestan hasta el inicio del desarrollo embrionario temprano y en algunos casos solamente son apreciables con claridad después de la implantación.⁷⁸

2.5.4.1. Condiciones medioambientales

Para lograr completar la maduración nuclear y citoplasmática los ovocitos recuperados requieren de un ambiente adecuado que permitan generar y completar los procesos biológicos necesarios. Un ambiente óptimo para la MIV está condicionada por factores como: pH, el cual debe mantenerse cercano al del plasma sanguíneo (pH 7,4), su control en el medio de maduración se realiza mediante la acción del CO₂ en la atmósfera de la incubadora, de ahí la importancia del bicarbonato que actúa como sustancia buffer y de otras sustancias tampón adicionadas al medio de cultivo como lo son las sales de Hepes; así mismo, la atmósfera gaseosa juega un papel importante en el control del pH intra y extra celular de las células en cultivo, por ello habitualmente se utilizan mezclas de gases en concentraciones de 5% de CO₂ en el aire, 5% de O₂ y 90% N₂; por otro lado, la variación del CO₂ en la atmósfera de la incubadora puede alterar el pH de los medios de cultivo pues a menor contenido de CO₂ en el ambiente, el medio se irá haciendo más alcalino y el color del medio de maduración se irá haciendo más violeta; por el contrario, si el medio se acidificará su color se acercaría al amarillo,

para un efectivo control visual de las variaciones de pH, se emplea el Rojo Fenol adicionado a los medios de cultivo.^{71, 79-80} Otro factor ambiental de importancia es la temperatura, datos experimentales plantean que la temperatura más adecuada para el cultivo *in vitro* de los ovocitos es de 38,5°C, además de que diversos autores emplean esta temperatura en sus investigaciones.⁸¹ La presión osmótica también es otro factor que condiciona la eficiencia de la MIV, en los medios de maduración lo ideal es que oscilen entre 265 y 325 mOsM, aunque los medios generalmente utilizados tienen osmolaridades cuyos valores oscilan entre 285 y 295 mOsM.⁸²⁻⁸³

2.5.4.2. Medios de maduración

En el mercado existen diferentes tipos de medios de cultivo para madurar ovocitos como: Ham's F-10 y Ham's F-12, Krebs Ringer Bicarbonato modificado, TCM-199 Medio Esencial Mínimo (MEM), Tyrodes y Waymouth MB752/1; sin embargo, el medio tradicional y más empleado en la maduración de ovocitos es el TCM-199 por permitir un mayor grado de fertilización, en comparación a los otros medios, está compuesto por sales de Earle con bicarbonato, suplementado con piruvato, lactato, vitaminas, aminoácidos, purinas y proteínas (albumina bovina o suero), aunque esta sea más utilizado en vacunos, es el mismo que se emplea en diferentes investigaciones de maduración de ovocitos de diferentes especies, ya sea suplementado o no.^{11, 71}

2.5.4.3. Suplementación de medios de maduración

Está claramente establecido la influencia significativa de los medios de cultivo empleados para la maduración *in vitro* de los ovocitos sobre las tasas de fertilización *in vitro*.⁸⁴

El medio de maduración empleado para 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 cúmulo y la producción de diversos factores que promueven el reinicio de la meiosis granulosa.⁸⁵⁻⁸⁶

Con la finalidad de incrementar la cantidad de ovocitos maduros se han venido utilizando otros suplementos como los factores de crecimiento en diferentes concentraciones (EGF, IGF-I, IGF-II, TGF), debido a que estos elementos favorecen la maduración de los ovocitos y actúan como agentes mitogénicos sobre las células de la granulosa.^{6, 8-10}

Por otro lado, las hormonas en la suplementación de los medios de maduración

juegan un papel importante, basado en el rol de las gonadotropinas LH y FSH, en el desarrollo folicular y del ovocito *in vivo*, debido a que estas son las responsables de la reanudación de la meiosis y de inducir la maduración de los folículos respectivamente.⁷⁹ Además de que la hormona LH suplementada en los medios de cultivo incrementa la energía disponible para el ovocito en el medio ambiente de cultivo favoreciendo la tasa de ovocitos madurados *in vitro*.⁸⁴

Así mismo, la suplementación de los medios de maduración también se realiza con esteroides, siendo los más utilizados el estradiol y la progesterona, donde la adición de ambos completa la maduración nuclear y citoplásmica. Por otro lado, la presencia del estradiol en el medio de maduración se considera un factor importante para la formación del pronúcleo masculino.⁸⁷

2.5.5. Fecundación *In Vitro* (FIV)

La fecundación es un proceso complejo que resulta de la unión del espermatozoide y el ovocito, este marca el inicio de la transición de ovocito a embrión; basado en ello, la FIV se define como un procedimiento por medio del cual los ovocitos maduros son cultivados junto con los espermatozoides para ser fecundados; por ello, para lograr una fecundación *in vitro* exitosa se requiere una apropiada preparación de ambos gametos, y también de condiciones de cultivo favorables.^{70, 88} La preparación de los gametos para someterlos a la FIV, consiste en obtener ovocitos que hayan llegado al estadio de metafase II y que los espermatozoides deben someterse a un proceso de lavado, selección y capacitación antes de ser cultivados juntamente con los ovocitos.

2.5.5.1. Lavado y selección de espermatozoides

Entre los procedimientos de lavado y selección de los espermatozoides para el proceso de FIV, generalmente se realizan las técnicas de selección por gradientes Percoll y el ``swim-up``. Estas técnicas tienen como objeto seleccionar los espermatozoides del plasma o diluyente seminal, para obtener una muestra con una población que tenga mayor porcentaje de espermatozoides móviles.¹¹

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 dos gradientes de percoll, en concentraciones diferentes (90% y 55%) diluido en medio de cultivo Sperm-TALP. El semen se siembra en la parte superior del tubo y se procede con la centrifugación. Los espermatozoides son separados en función de la densidad. Así, los espermatozoides cuya morfología nuclear es normal son los más densos,

por lo que se depositan en la fracción más rica en Percoll, mientras que los espermatozoides muertos o degenerados, el plasma seminal y el diluyente permanecen en la fracción menos densa.^{71, 89-90}

Por otro lado, la técnica de ``swim-up`` consiste en depositar la muestra de semen en el fondo de un tubo que contiene medio de cultivo a 37°C, este permitirá después de un tiempo de cultivo, que los espermatozoides móviles se desplacen hacia la superficie del tubo.⁹¹

2.5.5.2. Cocultivo de ovocitos con espermatozoides

Una vez que los espermatozoides han sido seleccionados, se realiza el cocultivo de estos con los ovocitos madurados *in vitro*.⁷¹ En esta etapa ocurre el reconocimiento y fusión de gametos, donde el espermatozoide tiene que atravesar las barreras presentes en el ovocito entre las que se encuentra las células del cúmulo, la zona pelúcida y la membrana plasmática. La reacción acrosomal puede ocurrir antes o después de la fijación de la cabeza espermática a los receptores glucoproteicos en la zona pelúcida, pero para la fijación es esencial que el gameto tenga el acrosoma intacto. La unión de la cabeza del espermatozoide a la zona pelúcida permite que ocurran interacciones con otros componentes de la zona, los cuales estimulan la activación del acrosoma.⁹²

2.5.5.3. Medios empleados y tiempo de cocultivo

El medio que básicamente se utiliza para la FIV se compone de un medio stock que puede ser TALP-FIV o TL suplementado con piruvato, BSA, gentamicina y heparina. La heparina es un glucosaminoglicano e induce la capacitación espermática, que finaliza en la reacción acrosomal y permite la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida del ovocito maduro. A su vez, el cocultivo *in vitro* de los espermatozoides con los ovocitos se realiza en un periodo de tiempo de 18 a 24 h.⁷⁰⁻⁷¹

2.5.6. Cultivo *In Vitro* de embriones (CIV)

Para el cultivo de cigotos y su posterior desarrollo *in vitro* se utilizan generalmente medios definidos como: Fluido de Oviducto Sintético (SOF), Fluido de Oviducto Sintético Modificado (SOFM); Charles Rosenkrans (CR1), Chatot Ziomek Bavister (CZB) y Medio Optimizado Simple de Potasio (KSOM). Estos medios eliminan la variabilidad de los resultados, la utilización extra de subproductos de origen animal y tienden a simplificar los sistemas de cultivo.⁷¹ Sin embargo, el que más se utiliza en la producción *in vitro* de embriones en diferentes especies es el medio SOF, que se caracteriza por ser un medio con bajos niveles de Sodio y altos

niveles de Potasio, comparados con los niveles plasmáticos. Estos dos elementos son cuidadosamente balanceados al formular los medios de cultivo, así como: el magnesio, calcio, bicarbonato, sulfatos y fosfatos. La composición iónica, el pH, la osmolaridad y el contenido macromolecular contenidas en el líquido oviductual difieren enormemente de los del plasma sanguíneo. Esta generalmente aceptado que el cloruro sódico es necesario para regular la osmolaridad del medio de cultivo y que el calcio y el potasio son esenciales para el desarrollo embrionario. La ausencia de calcio en el medio de cultivo resulta en una reducción de las divisiones embrionarias y una incapacidad para la compactación de las mórulas superficie.⁷⁰

2.5.6.1. Evaluación del desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario se evaluó de acuerdo a la tasa de división celular, así se dividió en:^{71, 93}

- **Segmentado (día 2-4):** De dos 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.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización de la zona de investigación y muestreo

La investigación se ejecutó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán-INIA-Ayacucho, ubicado en el distrito de Andrés Avelino Cáceres Dorregaray, provincia de Huamanga, región Ayacucho a una altitud de 2735 msnm y latitud 13° 10'09s (EEA Canaán-INIA-Ayacucho, datos no publicados).

Las muestras de ovarios y testículos de alpaca se colectaron en el Matadero Municipal de Huancavelica situado a 7 km de la ciudad, a una altitud de 3680 msnm, con una temperatura ambiental promedio de 11,5°C (Municipalidad Provincial de Huancavelica, datos no publicados).

3.2. Población y muestra

La población estuvo conformada por el total de alpacas sacrificadas en el Matadero Municipal de Huancavelica y se tomó como muestra 414 ovarios de manera no probabilística por las características de los mismos, para cuyo efecto, se consideró los criterios: oportunidad y cantidad de animales faenados.

3.3. Maduración *In Vitro* de ovocitos (MIV)

3.3.1. Obtención de ovarios

Los ovarios fueron colectados inmediatamente después de que las alpacas fueron faenadas. Los ovarios fueron extraídos directamente del útero, removiendo los tejidos, el oviducto y las grasas, luego fueron colocados en una bolsa de plástico que contenía Solución Salina Fisiológica 0,9% (SSF) con gentamicina (1ml/L de solución) a temperatura ambiente. Después de colectar todos los ovarios, la bolsa fue sellada y colocada en una caja isotérmica con gel refrigerante para mantenerlos a una temperatura de (4 - 9°C) durante el tiempo que duró el transporte al laboratorio (20 h).

En el laboratorio, los ovarios fueron lavados dos veces con SSF a temperatura

ambiente, para eliminar la sangre y remover algunos tejidos restantes, luego se enjuagaron otras dos veces con SSF con gentamicina (1ml/L de solución) a una temperatura de 37°C. Después de enjuagarlos, los ovarios se depositaron en un vaso de precipitado de 500 ml de capacidad que contenía 300 ml de SSF con gentamicina (1ml/L de solución) y se dejó a 37°C en Baño María hasta finalizar el desmenuzamiento de todos los ovarios.

3.3.2. Recuperación y selección de ovocitos

Los CCO se recuperaron utilizando la técnica de disección-ruptura folicular, técnica que consiste en diseccionar los folículos de 2-6 mm hasta aislar la integridad del folículo ovárico, para luego realizar la ruptura de la membrana del folículo en una placa de Petri, utilizando una hoja de bisturí N° 21.⁶⁹ Para realizar esta técnica, primero se secaron los ovarios con papel toalla, luego se colocaron uno a uno en una placa de Petri de 90 mm que contenía 10 ml de medio de manipulación a una temperatura de 37°C.

La selección de CCO se realizó en la misma placa de Petri con la ayuda de un estereoscopio (Motic, SMZ-168) con un aumento de 20X previsto de una platina térmica (Neovet, TIC-17RGTi) a 38°C, con la finalidad de mantener la temperatura constante. La clasificación se realizó categorizándolos del I al IV según la compactación del cúmulo y el aspecto citoplasmático, para lo cual se utilizó una micropipeta de 10 µl.^{63, 76}

Para la maduración *in vitro*, se seleccionó CCO de categoría I, II y III, descartando aquellos ovocitos que tenían menos de una capa de células de cúmulo, con cúmulos muy oscuros y aquellos con citoplasma irregular; los ovocitos seleccionados fueron colocados en una placa de Petri de 35 mm que contenía medio de manipulación a 37°C. Se lavó dos veces con medio de manipulación y por último con medio de maduración para luego ser depositadas en placas Well de cuatro pocillos.

3.3.3. Maduración *In Vitro* de ovocitos (MIV)

Los ovocitos seleccionados como aptos para la maduración fueron distribuidos al azar en cada pocillo de las placas Well, que contenía 500 µl de medio de maduración (MM), constituido por: TCM-199 (M-4530, Sigma), piruvato de sodio (0,011 g/ml), 17-β estradiol (22,2 mg/ml), L-glutamina (0,015 g/ml), FSH (0,5 mg/ml), LH (0,5 mg/ml), SFB (5%), gentamicina (80 mg/ml) y suplementado con FC según tratamiento. Se diseñaron cinco tratamientos:

T1: Medio de maduración + 10 ng/ml de IGF-I

T2: Medio de maduración + 50 ng/ml de IGF-I

T3: Medio de maduración + 10 ng/ml de EGF

T4: Medio de maduración + 50 ng/ml de EGF

T5: Medio de maduración sin FC

El medio de maduración suplementado con FC, distribuidos en las placas Well, fueron colocados en la incubadora durante 2 h (tiempo de equilibrio) antes de colocar los ovocitos seleccionados. Posteriormente, se colocaron entre 15 a 35 ovocitos en cada pocillo. Finalmente, las placas se colocaron en una incubadora por un tiempo de 32 h a una temperatura de 38,5°C; con una atmósfera 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa.⁷⁰⁻⁷¹

3.3.4. Valoración del estadio nuclear de los ovocitos

La evaluación de los estadios de maduración nuclear de los ovocitos se realizó mediante la técnica de fijación y tinción.^{7, 71} Transcurrido el tiempo de maduración, se retiró el 30% de ovocitos de cada uno de los tratamientos para ser fijados por 36 h a 4°C en solución fijadora de metanol y ácido acético (3:1); para ello, se retiró todas las células del cúmulo adheridas a la zona pelúcida mediante la aspiración y expulsión repetida de volúmenes de 100 µl con la ayuda de una micropipeta; luego, los ovocitos desnudos se colocaron en un tubo eppendorf de 250 µl de capacidad con 50 µl de solución fijadora. Después de culminar el proceso de fijación, los ovocitos se colocaron sobre un portaobjetos previamente desengrasado y sobre ellos se colocó el cubreobjetos que tenía vaselina en cada extremo, se presionó ligeramente hasta contactar con la gota, evitando que los ovocitos se revienten o se pierdan. Luego, se tomó el colorante (orceína acética al 2%) con una micropipeta de 10 µl y se dejó caer una 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 15 min. Pasado este tiempo se procedió a evaluar la morfología nuclear de los ovocitos teñidos, en microscopio óptico, a 400X, 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* de presuntos cigotos (FIV)

El 70% de ovocitos sometidos a maduración se fertilizaron con espermatozoides congelado recuperado de epidídimos.

3.4.1. Recuperación y selección de espermatozoides

Los espermatozoides se recuperaron a partir de testículos de alpacas faenadas

en el Matadero Municipal de Huancavelica, para ello, se colectaron testículos con diámetros superiores a 3 cm, estos fueron trasladados al laboratorio a temperatura ambiente en una caja isotérmica. En el laboratorio, se procedió a limpiarlos y secarlos con papel absorbente, luego se procedió a descapsularlos y se separó los conductos deferentes y el epidídimo, para posteriormente depositarlos en una placa de Petri de 90 mm. Adicionalmente se dispuso de una placa de Petri de 35 mm que contenía solución dilutora (Andromed) a una temperatura de 37°C para recepcionar los espermatozoides; después se procedió a realizar cortes transversales del epidídimo y hacer la recuperación respectiva de los espermatozoides. Se dejó a temperatura ambiente durante 10 min, luego se tomó una pequeña muestra y se observó la concentración y viabilidad en el microscopio. Si los espermatozoides recuperados se encontraban dentro de los parámetros, se procedió a congelarlos en tubos eppendorf de 500 µl de capacidad.⁷¹

Los espermatozoides recuperados se lavaron y seleccionaron mediante la Técnica de Gradiente de Percoll de la siguiente manera: Se procedió a descongelar el semen contenidos en los tubos eppendorf, a una temperatura de 37°C en Baño María. Paralelo a ello se prepararon los gradientes de Percoll depositando 100 µl de Percoll al 22,5% en un tubo eppendorf de 1,5 ml, por las columnas y con mucho cuidado se añadió 100 µl de Percoll al 45%, observando la formación de un anillo entre las dos soluciones, luego se enrazó con 200 µl de espermatozoides descongelado, evitando en todo momento que se mezclen, observando claramente la formación de tres capas. Se llevó a centrifugar a 331,91 x g durante 20 min, se eliminó el sobrenadante e inmediatamente se adicionó 100 µl de medio de capacitación y se volvió a centrifugar a 331,91 x g durante 10 min, una vez finalizada la última centrifugación se eliminó el sobrenadante y al sedimento se añadió 50 µl de medio de fecundación para la dilución y posterior cocultivo con los ovocitos. Los espermatozoides seleccionados y capacitados se observaron con un microscopio para determinar la concentración aproximada de $1-2 \times 10^6/\text{ml}$.⁷

3.4.2. Preparación de los ovocitos

Finalizado el tiempo de maduración *in vitro* (32 h), los ovocitos se lavaron tres veces en medio de fecundación, para luego ser depositados en 500 µl de medio de fertilización previamente acondicionado (1 h en la incubadora de CO₂), dispuestos en cada pocillo de las placas Well hasta el momento del enfrentamiento con los espermatozoides.

3.4.3. Cocultivo de ovocitos y espermatozoides

Después de la preparación y acondicionamiento de los gametos, se procedió a realizar el cocultivo de los ovocitos y los espermatozoides; para ello, se añadió 10 μ l de suspensión de espermatozoides capacitados a los pocillos de las placas Well en el cual se encontraban los ovocitos maduros. Los ovocitos y espermatozoides juntos se incubaron durante 18 h a una temperatura de 38,5°C; con una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa.

3.5. Cultivo *In Vitro* de embriones (CIV)

Después de las 18 h post fecundación, los presuntos cigotos fueron denudados por aspiración y expulsión repetida de volúmenes de 100 μ l con la ayuda de una micropipeta, luego fueron lavados en gotas de medio SOF y se depositaron en placas Well con 500 μ l de medio de cultivo SOF por cada pocillo, previamente acondicionado (1 h en la incubadora de CO₂). Las placas Well fueron colocadas dentro de una bolsa de polietileno con mezcla de gases: 5% de CO₂, 5% de O₂ y 5% de N₂ en aire, luego fueron selladas en los extremos y se incubaron durante 7 días a una temperatura 38,5°C; con una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa.⁷⁰

3.6. Evaluación de los resultados

3.6.1. Clasificación de ovocitos

Después de la recuperación de los Complejos Cúmulo-Ovocito (CCO), estos se clasificaron de acuerdo a la compactación del cúmulo y su aspecto citoplasmático.^{63, 76}

3.6.2. Evaluación del estadio nuclear de los ovocitos

Al finalizar el periodo de maduración, los ovocitos se evaluaron siguiendo el progreso meiótico, de acuerdo a los criterios establecidos.³⁹

3.6.3. Evaluación del desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario se evaluó de acuerdo a la tasa de división celular, después de siete días post fecundación.^{71, 93}

3.7. Diseño estadístico

El tipo de investigación fue básica-experimental, con un Diseño Completamente al Azar (DCA); se realizó 12 repeticiones por tratamiento para determinar la tasa de maduración y 10 repeticiones por tratamiento para determinar la tasa de desarrollo embrionario. Se utilizó análisis de varianza (ANOVA, $\alpha=0,05$) para la comparación de las diferencias estadísticas de los datos que cumplían los criterios de distribución normal y homogeneidad; para observar la diferencia entre

tratamientos se utilizó la prueba de Duncan. Por otro lado, para los datos que no cumplían con los criterios anteriormente mencionados, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y para observar la diferencia entre los tratamientos se utilizó la prueba de Bonferroni, a un nivel de confianza del 95%. El modelo estadístico a utilizar para describir una observación fue:

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

Donde:

Y_{ij} : observaciones (% VG, GVBD, MI y MII; mórula y blastocistos)

μ : media poblacional

T_i : efecto de los tratamientos (T1, T2, T3, T4 y T5)

e_{ij} : error experimental.

El análisis de datos se realizó utilizando el programa estadístico R 3.4.3.

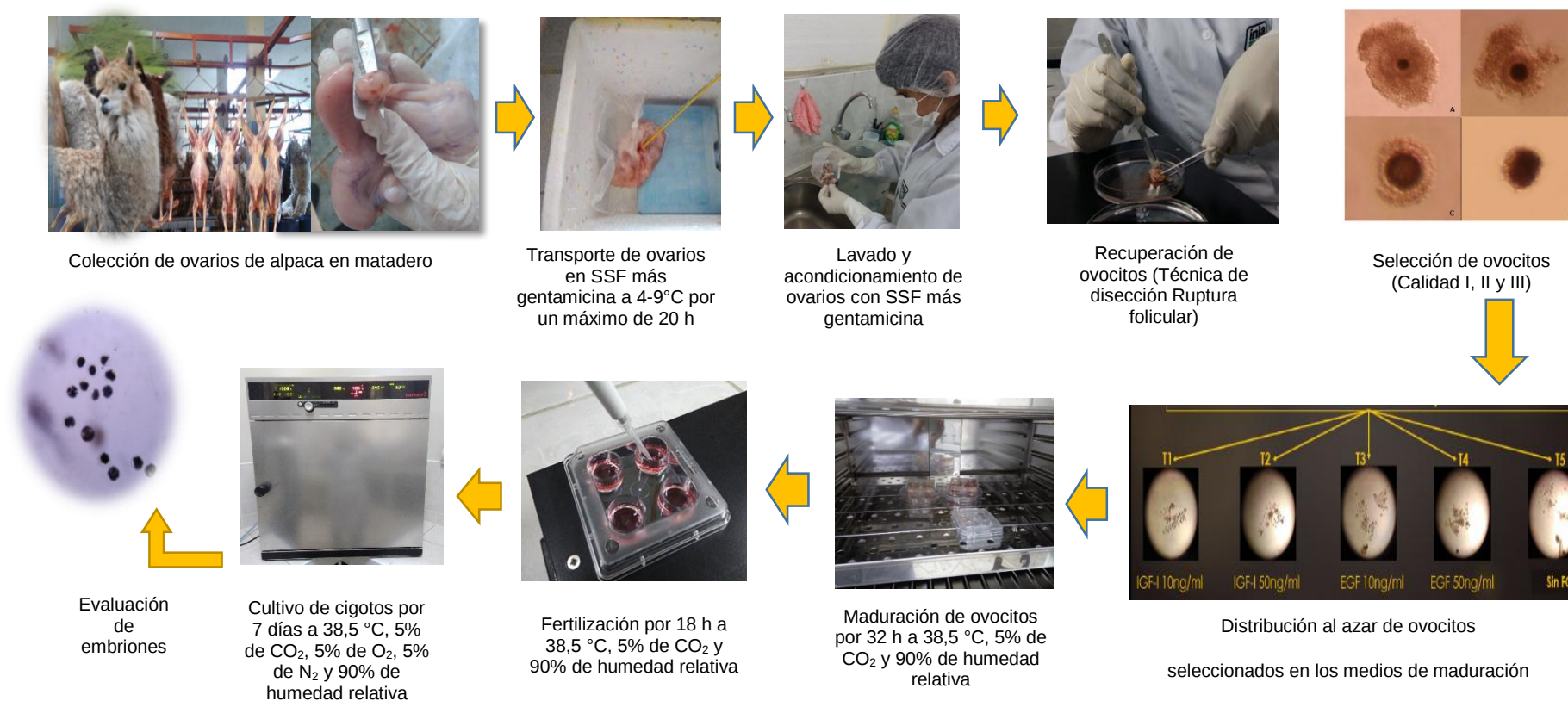


Figura 4. Flujograma general de producción *in vitro* de embriones de alpaca, utilizando factores de crecimiento en la suplementación del medio de maduración. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero -setiembre, 2017)

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Recuperación de ovocitos (media $\pm$ SD) mediante la técnica de disección-ruptura folicular de ovarios de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

N° Total de Ovarios	414
N° Total de Ovocitos recuperados	2369
Media de Ovocitos / Ovario $\pm$ SD	5,92 $\pm$ 1,48
Coefficiente de Variabilidad (%)	25,02
Mínimo	3,77
Máximo	8,58

SD: Desviación Estándar

Tabla 2. Categorización morfológica (media $\pm$ SD) de ovocitos recuperados de ovarios de alpaca, mediante la técnica de disección-ruptura folicular, según calidad. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

Repetición	Categorías morfológicas (%)			
	Calidad I	Calidad II	Calidad III	Calidad IV
1	25,23	35,51	22,43	16,82
2	13,10	32,75	42,79	11,35
3	21,58	41,05	26,84	10,53
4	23,26	37,67	21,86	17,21
5	11,29	51,61	18,55	18,55
6	21,36	33,50	26,70	18,45
7	16,34	38,56	30,72	14,38
8	17,68	32,04	39,23	11,05
9	13,33	35,93	38,89	11,85
10	22,11	37,37	30,53	10,00
11	16,27	28,92	43,37	11,45
12	20,00	37,84	31,89	10,27
% $\pm$ SD	18,46 $\pm$ 4,46	36,90 $\pm$ 5,70	31,15 $\pm$ 8,37	13,49 $\pm$ 3,37

SD: Desviación estándar.

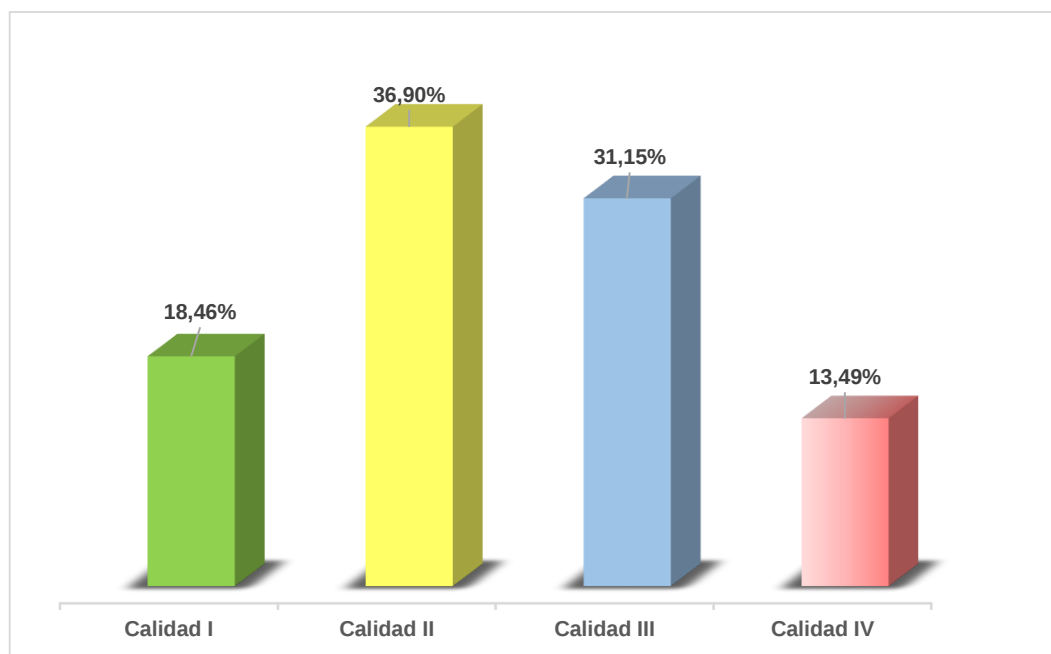


Figura 5. Porcentaje promedio de la categorización morfológica de ovocitos de alpaca, según calidad. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

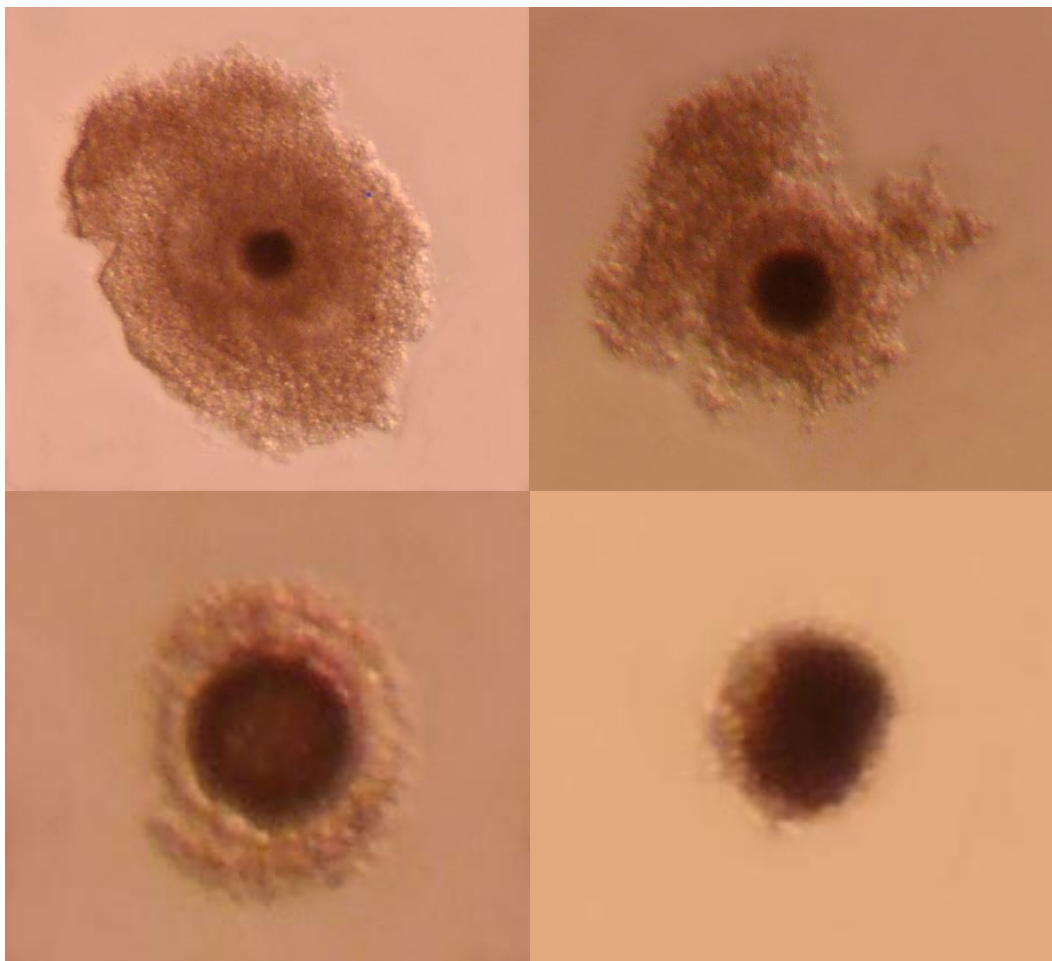


Figura 6. Categorías morfológicas de ovocitos de alpaca, según calidad. Estereoscopio (Motic, SMZ-168). Objetivo 20X. (A) Calidad I: Ovocito con más de 5 capas de células del cúmulo compacto, claro y transparente; (B) Calidad II: Ovocito rodeado por 2-4 capas células del cúmulo; (C) Categoría III: Ovocito parcialmente rodeado por células de cúmulo, entre uno o menos; (D) Categoría IV: Ovocito desnudo, rodeado sólo por la zona pelúcida. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

Tabla 3. Porcentaje promedio de ovocitos de alpaca aptos para la maduración *in vitro*, recuperados mediante la técnica de disección-ruptura folicular. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

Variable	% Promedio $\pm$ SD	Coficiente de variabilidad, %	Mínimo	Máximo
Porcentaje de ovocitos aptos para la maduración	86,51 $\pm$ 3,37	3,89	81,45	90,00

SD: Desviación Estándar

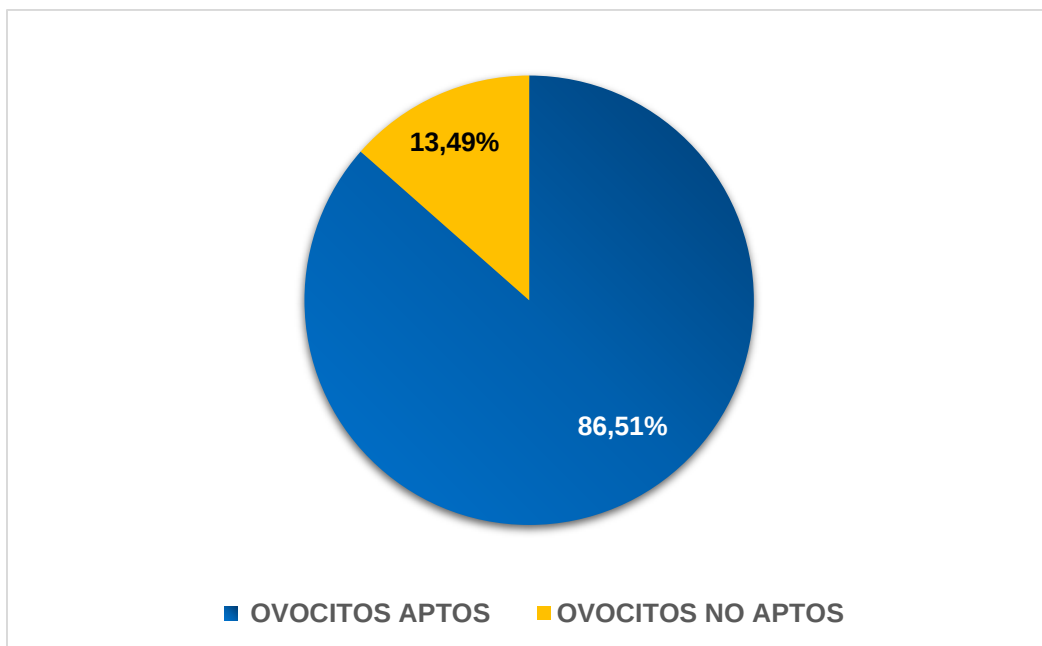


Figura 7. Porcentaje promedio de ovocitos de alpaca aptos y no aptos para la maduración *in vitro*, recuperados mediante la técnica de disección-ruptura folicular. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

Tabla 4. Efecto de factores de crecimiento en el porcentaje (media $\pm$ SD) de los estadios de maduración nuclear de ovocitos de alpaca, según tratamiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

Tratamientos	n	Estadios de maduración nuclear				
		Media de ovocitos inmaduros			Nº ovocitos maduros	Nº de ovocitos
		(% $\pm$ SD)			(% $\pm$ SD)	degenerados
		VG	GVBD	MI	MII	(% $\pm$ SD)
T1: MM + IGF-I 10 ng/ml	12	0,69 $\pm$ 2,4 ^a	10,10 $\pm$ 8,57 ^a	5,57 $\pm$ 6,47 ^a	61,81 $\pm$ 21,22 ^a	21,83 $\pm$ 17,80 ^a
T2: MM + IGF-I 50 ng/ml		2,08 $\pm$ 5,18 ^a	6,88 $\pm$ 10,87 ^a	10,14 $\pm$ 12,15 ^a	50,28 $\pm$ 21,18 ^{ab}	30,62 $\pm$ 26,14 ^a
T3: MM + EGF 10 ng/ml		0,76 $\pm$ 2,62 ^a	4,23 $\pm$ 7,07 ^a	13,33 $\pm$ 14,65 ^a	49,59 $\pm$ 18,70 ^{ab}	32,10 $\pm$ 20,68 ^a
T4: MM + EGF 50 ng/ml		4,85 $\pm$ 9,72 ^a	5,93 $\pm$ 7,78 ^a	9,67 $\pm$ 10,20 ^a	52,86 $\pm$ 16,94 ^{ab}	26,70 $\pm$ 18,75 ^a
T5: MM sin FC		5,36 $\pm$ 8,70 ^a	10,90 $\pm$ 11,54 ^a	13,68 $\pm$ 18,26 ^a	42,22 $\pm$ 16,56 ^b	27,84 $\pm$ 20,24 ^a

VG: Vesícula Germinal; GVBD: Vesícula Germinal Rota; MI: Metafase I; MII: Metafase

^{ab}: Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias estadísticas significativas (p<0,05)

SD: Desviación Estándar

MM: Medio de Maduración

FC: Factor de Crecimiento

n: Número de réplica

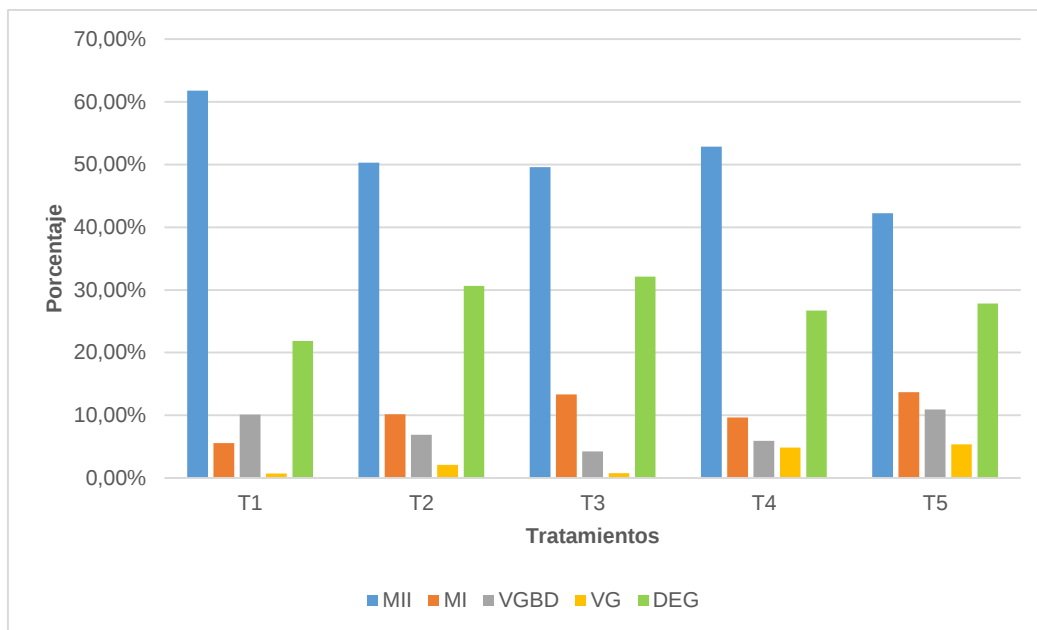


Figura 8. Porcentaje promedio de ovocitos de alpaca en estadio de Metafase II (MII), Metafase I (MI), Vesícula Germinal Rota (VGBD), Vesícula Germinal (VG) y degenerados (DEG), según tratamiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

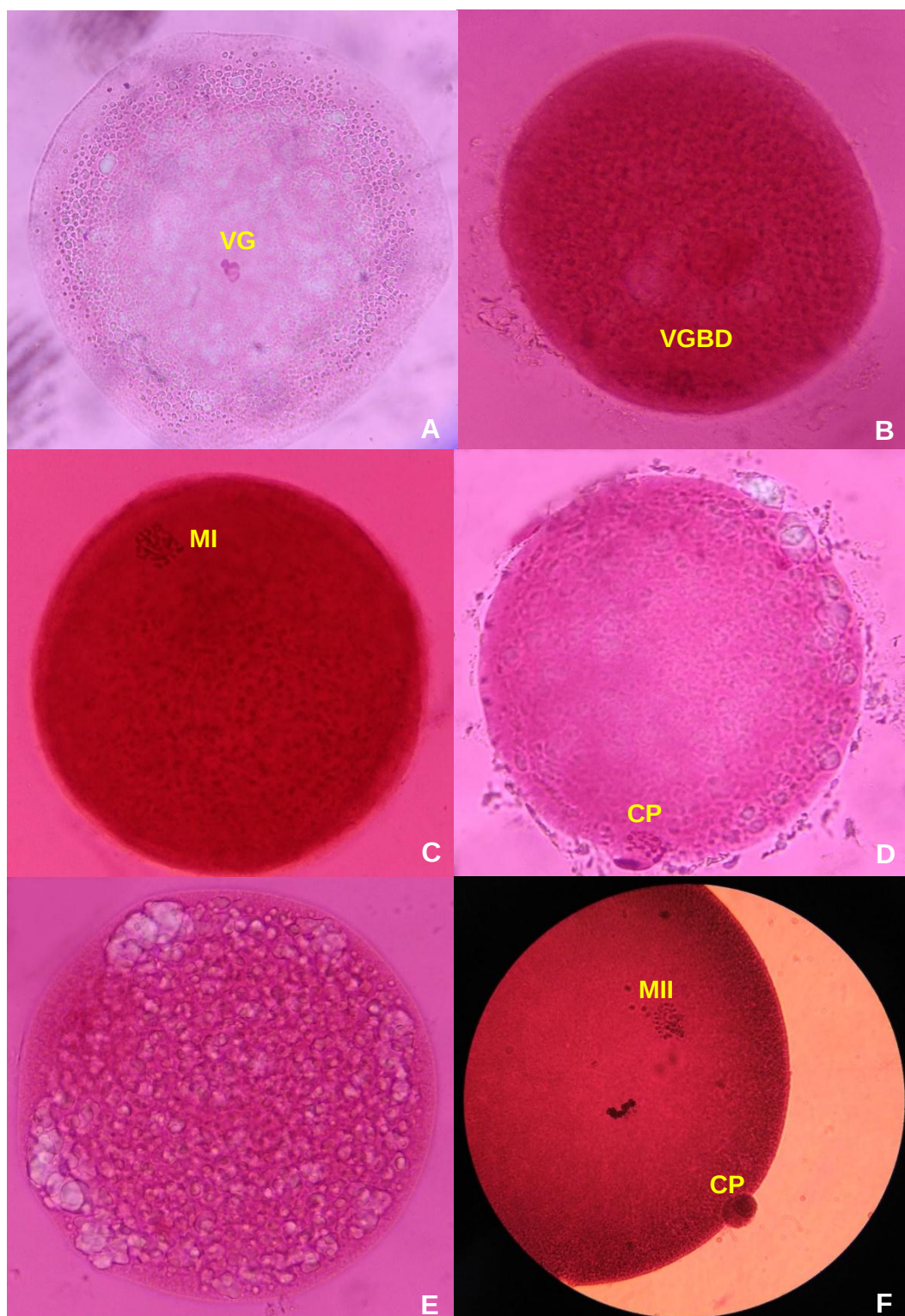


Figura 9. Estadíos de maduración nuclear de ovocitos de alpaca. Tinción con orceína acética al 2%. Microscopio óptico (ACCU-SCOPE). Objetivo 40X. (A) Vesícula Germinal (VG); (B) Vesícula Germinal Rota (VGBD); (C) Meiosis I (MI); (D y F) Metafase II (MII) presencia del Primer Cuerpo Polar (CP); (E) Ovocito Degenerado. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

Tabla 5. Tasa de maduración nuclear (media $\pm$ SD) de ovocitos de alpaca madurados *in vitro* con factores de crecimiento, según tratamiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

Tratamientos	n	Tasa de		
		maduración nuclear (media $\pm$ SD)	Máximo	Mínimo
T1: MM + IGF-I 10 ng/ml	12	61,81 $\pm$ 21,22 ^a	88,89	25,00
T2: MM + IGF-I 50 ng/ml		50,28 $\pm$ 21,18 ^{ab}	80,00	16,67
T3: MM + EGF 10 ng/ml		49,59 $\pm$ 18,70 ^{ab}	86,67	18,18
T4: MM + EGF 50 ng/ml		52,86 $\pm$ 16,94 ^{ab}	76,92	20,00
T5: MM sin FC		42,22 $\pm$ 16,56 ^b	75,00	16,67

SD: Desviación Estándar

MM: Medio de Maduración

FC: Factor de Crecimiento

n: Número de réplica

^{ab}: Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$)

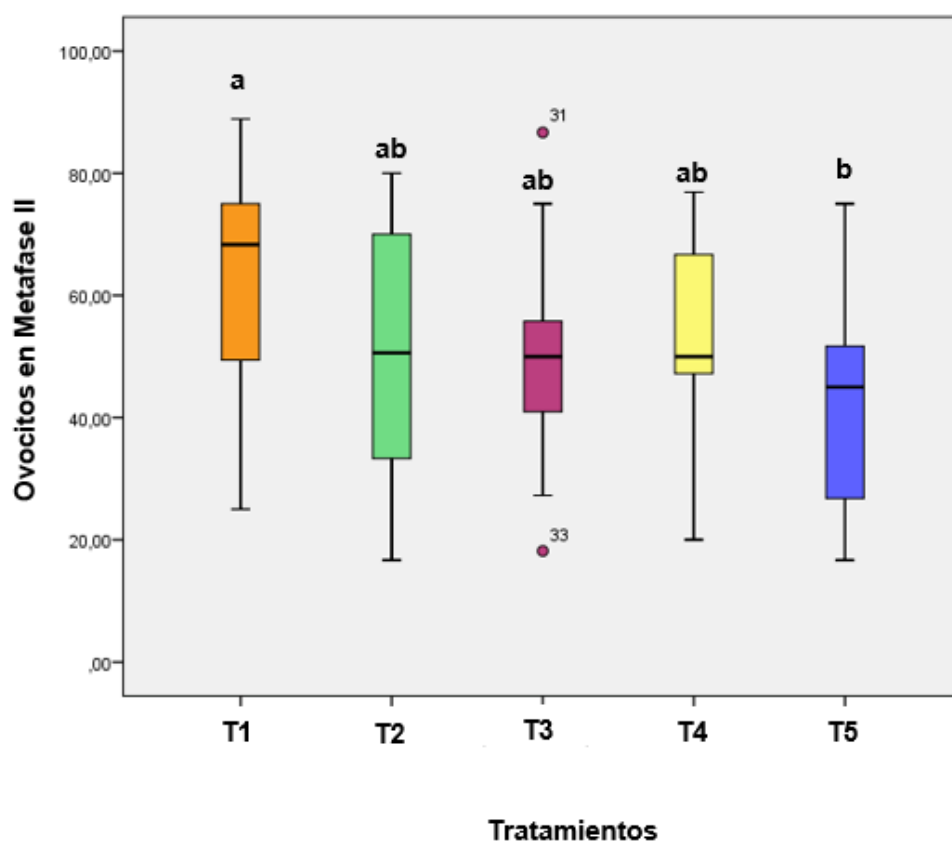


Figura 10. Comparación de medianas de ovocitos de alpaca en Metafase II, madurados *in vitro* con factores de crecimiento, según tratamiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

Tabla 6. Efecto de factores de crecimiento en el medio para MIV sobre el porcentaje (media $\pm$ SD) de desarrollo embrionario *in vitro* de alpaca, según tratamiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

Tratamientos	n	Estadíos del desarrollo embrionario (media $\pm$ SD)			
		Segmentados	Mórulas	Blastocistos	Degenerados
		($\alpha=0,05$)	($\alpha=0,10$)	($\alpha=0,05$)	($\alpha=0,05$)
T1: MM + IGF-I 10 ng/ml	10	1,87 $\pm$ 3,04 ^a	26,72 $\pm$ 11,26 ^{ab}	7,88 $\pm$ 4,05 ^a	63,53 $\pm$ 11,07 ^a
T2: MM + IGF-I 50 ng/ml		1,06 $\pm$ 2,23 ^a	30,12 $\pm$ 11,00 ^{ab}	6,72 $\pm$ 4,79 ^a	62,11 $\pm$ 8,40 ^a
T3: MM + EGF 10 ng/ml		1,10 $\pm$ 2,35 ^a	32,01 $\pm$ 11,35 ^b	6,18 $\pm$ 5,19 ^a	60,71 $\pm$ 10,48 ^a
T4: MM + EGF 50 ng/ml		3,41 $\pm$ 5,68 ^a	33,53 $\pm$ 19,99 ^{ab}	5,48 $\pm$ 5,44 ^a	57,59 $\pm$ 15,85 ^a
T5: MM + sin FC		0,83 $\pm$ 2,64 ^a	23,30 $\pm$ 6,54 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	75,86 $\pm$ 6,12 ^b

SD: Desviación Estándar

MM: Medio de Maduración

FC: Factor de Crecimiento

n: Número de réplica

^{ab}: Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$)

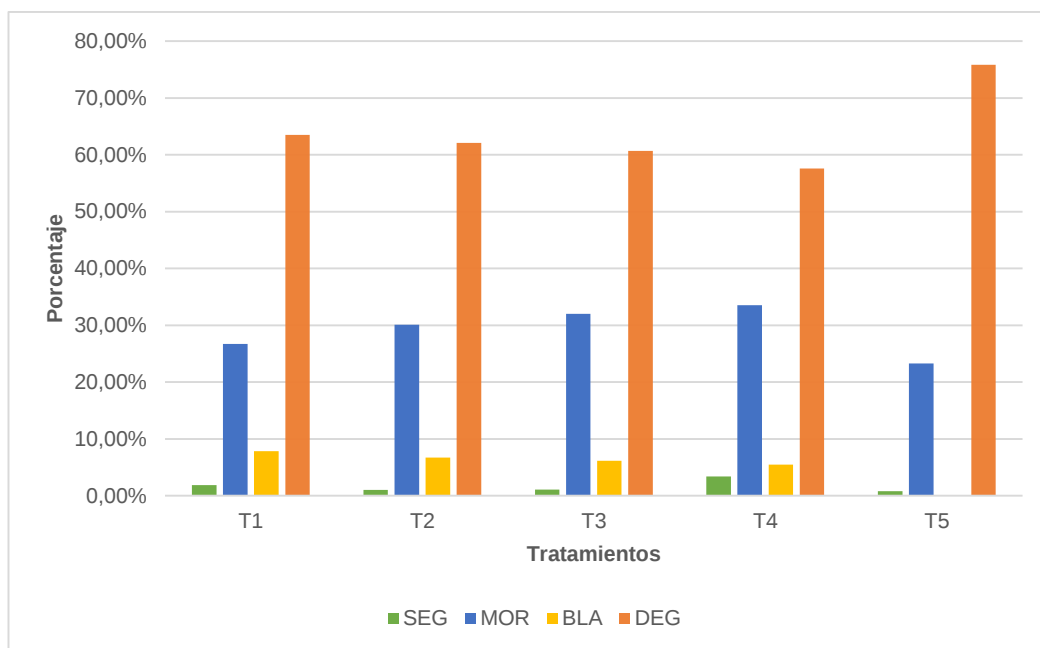


Figura 11. Porcentaje de desarrollo embrionario de alpaca en estadíos de Segmentados (SEG), Mórulas (MOR), Blastocistos (BLA) y degenerados (DEG), según tratamiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

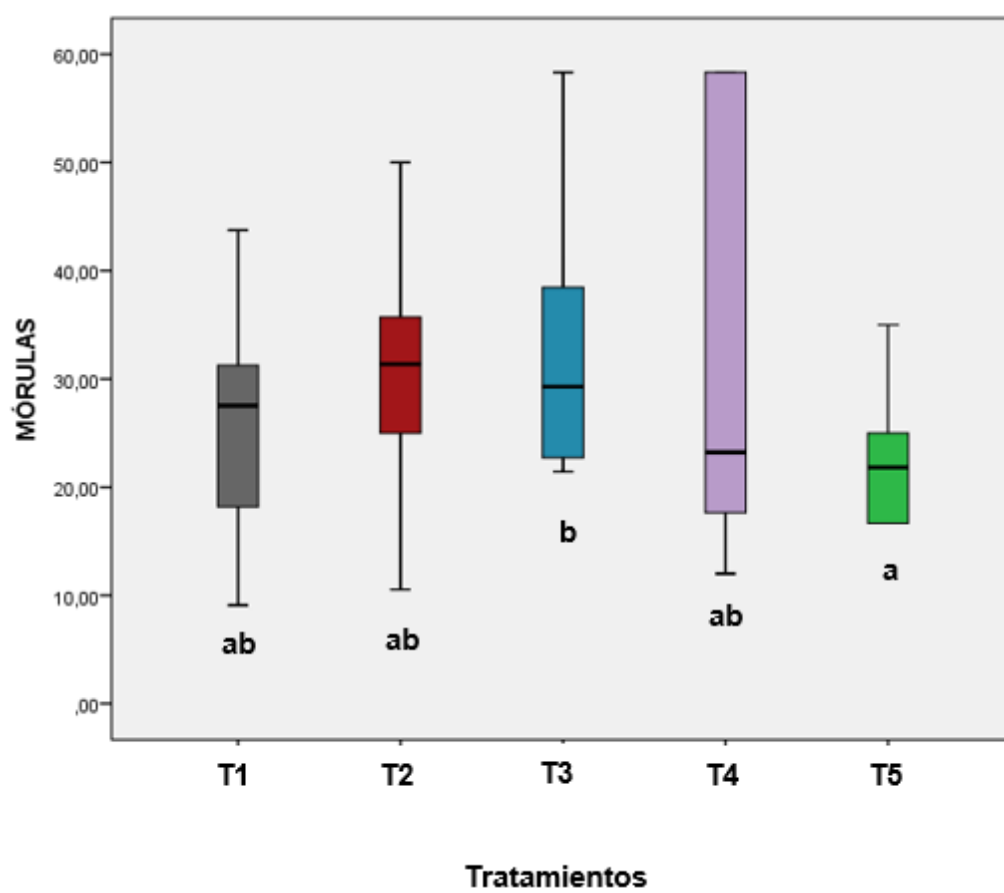


Figura 12. Comparación de medianas de mórulas de alpaca con adición de FC al medio para MIV, según tratamiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

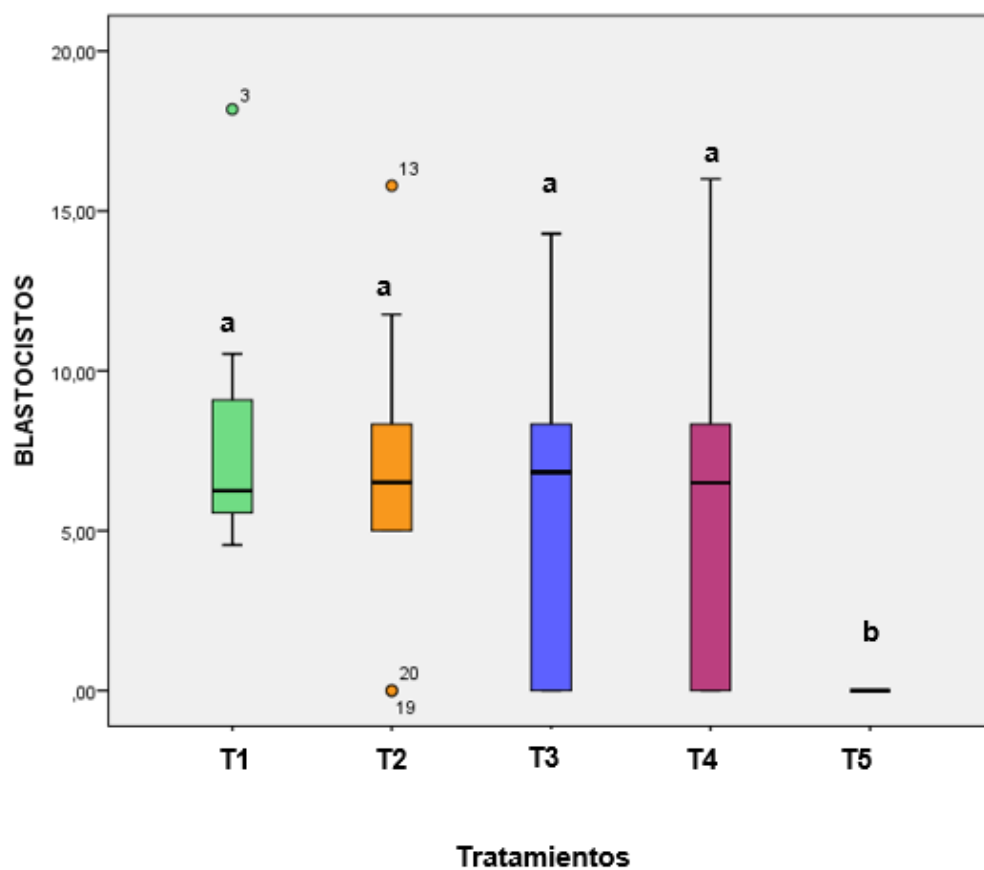


Figura 13. Comparación de medianas de blastocistos de alpaca con adición de FC al medio para MIV, según tratamiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

Tabla 7. Tasa de desarrollo embrionario de alpaca (media $\pm$ SD) y mediana cultivados *in vitro* con adición de factores de crecimiento al medio para MIV, según tratamiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

Tratamiento	n	Tasa de desarrollo embrionario (media $\pm$ SD)	Mediana	Mínimo	Máximo
T1: MM + IGF-I 10 ng/ml	10	34,60 $\pm$ 9,73	34,845 ^{ab}	22,73	50,00
T2: MM + IGF-I 50 ng/ml		36,84 $\pm$ 8,80	37,255 ^b	23,53	50,00
T3: MM + EGF 10 ng/ml		38,19 $\pm$ 11,14	33,480 ^b	27,27	58,33
T4: MM + EGF 50 ng/ml		39,00 $\pm$ 18,90	29,000 ^{ab}	17,65	66,67
T5: MM + sin FC		23,30 $\pm$ 6,54	21,825 ^a	16,67	35,00

SD: Desviación Estándar

MM: Medio de Maduración

FC: Factor de Crecimiento

n: Número de réplica

^{ab}: Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$)

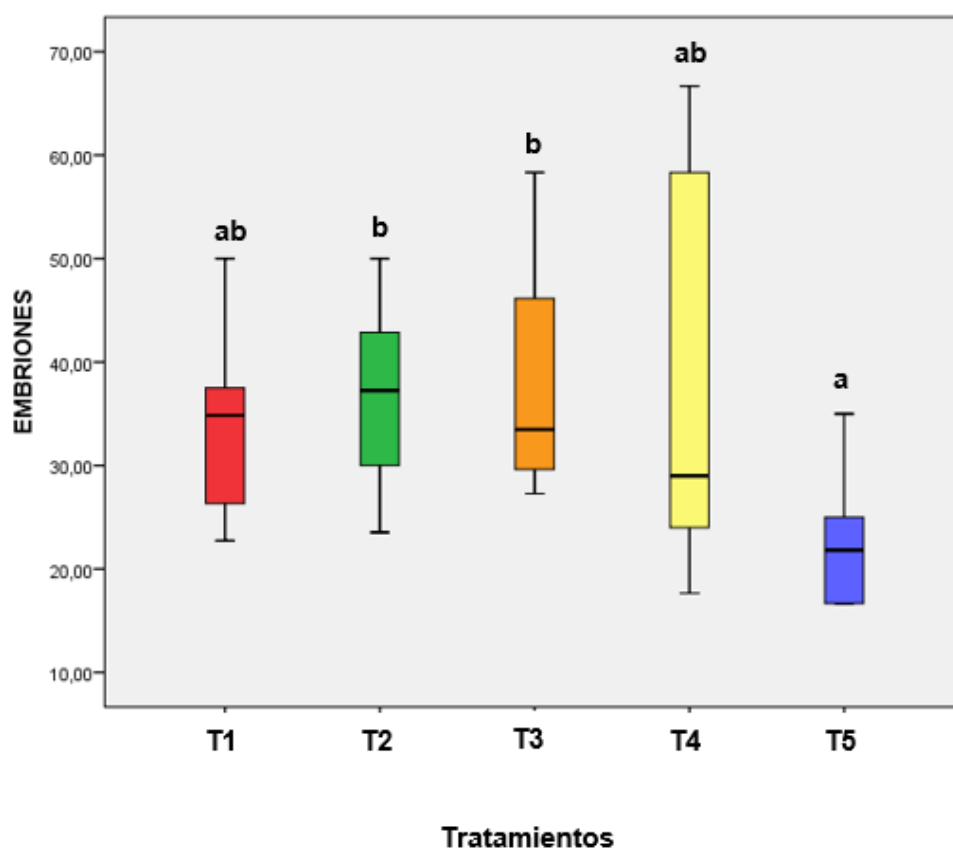


Figura 14. Comparación de medianas de embriones de alpaca con adición de FC al medio para MIV, según tratamiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

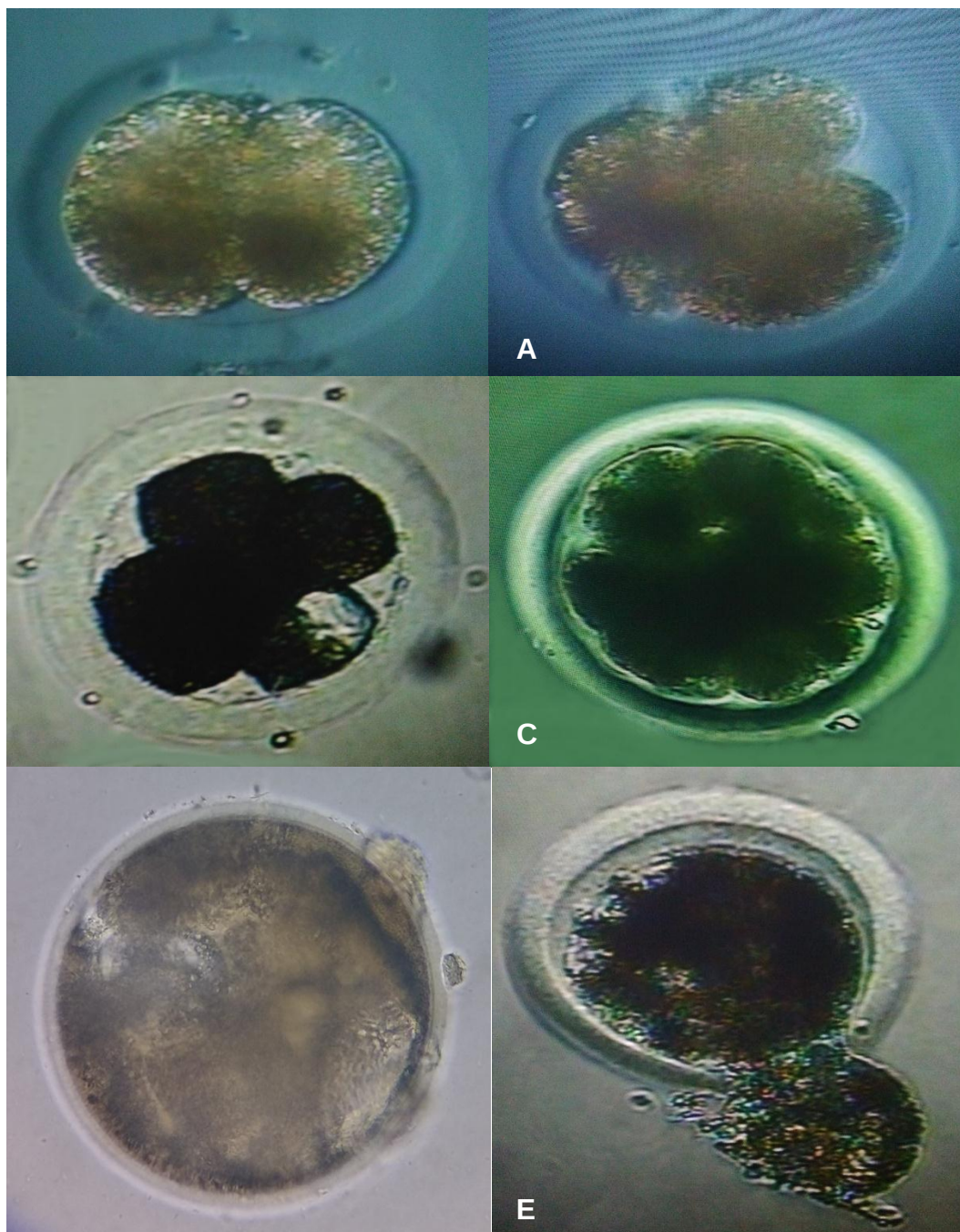


Figura 15. Estadíos de desarrollo embrionario de alpaca, después de 07 días de CIV. Microscopio invertido (AXIO). Objetivo 40X. (A) embrión en división de dos células; (B y C) embrión en división de cuatro células; (D) embrión en estadio de mórula; (E) embrión en estadio de blastocisto expandido; (F) embrión en estadio de blastocisto protruido. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

V. DISCUSIÓN

5.1. Recolección de ovarios, recuperación y selección de ovocitos

En el presente trabajo de investigación se recuperaron y seleccionaron ovocitos, a partir de ovarios de *Vicugna pacos* “alpaca” recolectados en matadero; los cuales fueron transportados en SSF con antibiótico a una temperatura de 4-9°C y utilizados antes de las 20 h. La recolección de ovarios *post mortem*, la recuperación y selección de ovocitos, constituye por lo general la etapa inicial del proceso de producción *in vitro* de embriones; en tal sentido, la obtención de ovarios de hembras faenadas en matadero, es una fuente abundante de ovocitos obtenidos a bajo costo; además, se ha demostrado que la capacidad de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos, no depende del ciclo estral en que son obtenidos los folículos,^{65, 73} por lo que se pueden madurar *in vitro* ovocitos de otros mamíferos recuperados de ovarios *post mortem*. Sobre esta base, la recolección de ovarios se realizó del total de hembras faenadas en el Matadero Municipal de Huancavelica, las que fueron empleadas al azar como donantes de ovocitos, para cuyo efecto se consideró los criterios de oportunidad y cantidad de beneficios. En el presente estudio, se recolectaron 414 ovarios, recuperando un total de 2369 ovocitos, haciendo un promedio de recuperación de $5,92 \pm 1,48$ ovocitos por ovario (Tabla 1); empleando la técnica de disección-ruptura folicular.

El número total de ovocitos recuperados por ovario, varía de acuerdo al método de recuperación empleado. De este modo, se han realizado comparaciones de recuperación de CCO en alpacas, bovinos, ovinos y otras especies de interés. Es así que, se ha reportado que la mayor cantidad de CCO de alpacas, se han recuperado con la técnica de disección-ruptura folicular, obteniendo una recuperación de $4,08 \pm 1,15$ ovocitos por ovario, frente al *slicing* folicular y aspiración folicular ($3,77 \pm 1,25$ y $3,21 \pm 1,19$ ovocitos por ovario, respectivamente).⁶⁹ El resultado obtenido del número total de ovocitos por ovario en el presente trabajo, se encuentra en un rango superior a lo obtenido en el

estudio mencionado anteriormente, por lo que es importante señalar que la variabilidad en la obtención de ovocitos por ovario, se debe muchas veces a la experiencia y habilidad del operador para diseccionar y aislar la integridad del folículo ovárico; además, de las variaciones propias de cada donante de ovario (edad del animal, raza y estado reproductivo).

Así mismo, otra investigación señaló que al realizar la comparación de dos métodos de recuperación de ovocitos (desmenuzado del tejido ovárico y aspiración folicular), la mayor cantidad de recuperación de ovocitos de llama, resultó con el método de desmenuzado de tejido ovárico (27 ovocitos por llama); mientras que, con el método de aspiración folicular sólo se obtuvo 6,4 ovocitos por llama.⁸³ Otro reporte indica también que, el número de ovocitos recuperados fue superior por el método de corte ($10,00 \pm 7,01$ y $8,25 \pm 4,96$) comparando con el método de aspiración folicular ($4,50 \pm 2,06$ y $3,10 \pm 1,68$) para alpacas y llamas respectivamente.⁶⁶ Cabe resaltar que, la mayor cantidad de recuperación de ovocitos está dada cuando se logra realizar cortes en los folículos del ovario.

Por otro lado, algunos autores señalan que el hecho de realizar cortes al azar tanto de la superficie ovárica como del interior, produce la 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;⁹⁴ razón por la cual, muchos investigadores optan por emplear el método de aspiración folicular, al haber mayor control en aspirar folículos de 2 – 6 mm de diámetro.^{7, 65, 70-71} Sin embargo, al emplear el método de disección-ruptura folicular, lo primero que se hace, es seleccionar los folículos de entre 2 a 6 mm de diámetro para realizar la disección, hasta aislar la integridad del folículo y luego se procede a realizar la ruptura con la ayuda de un bisturí, por lo que se minimiza la obtención de ovocitos con menor capacidad de maduración *in vitro*.⁶⁹

En la Tabla 2 y Figura 5, se indica el porcentaje promedio de la categorización morfológica de ovocitos recuperados de ovarios de alpaca, mediante la técnica de disección-ruptura folicular (Figura 6); los cuales fueron: $18,46 \pm 4,46\%$; $36,90 \pm 5,70\%$; $31,15 \pm 8,37\%$ y $13,49 \pm 3,37\%$ para ovocitos de calidad I, II, III y IV; respectivamente. Estos valores difieren con el resultado obtenido en un trabajo de investigación, donde aparte de realizar la evaluación del efecto de dos métodos de recuperación de ovocitos de alpacas sobre la cantidad, también realizaron la evaluación sobre la calidad de los ovocitos; obteniendo los siguientes resultados: 30,00% (calidad I), 31,00% (calidad II), 23,50% (calidad III) y 15,50% (calidad IV).⁶⁶

La diferencia porcentual en las diferentes categorías, posiblemente se deba al factor ambiental, tiempo y temperatura de transporte del ovario desde el lugar de recolección hasta el laboratorio; ya que, en la investigación anteriormente mencionada utilizaron ovarios de alpaca transportados a 35°C durante 5 a 6 h; mientras que en la presente investigación los ovarios se transportaron a una temperatura de 4 - 9°C por un periodo de 20 h.

La calidad de los ovocitos obtenidos a partir de ovarios colectados en matadero, está directamente relacionada con tres variables involucradas: recolección y transporte de ovarios, métodos e instrumental empleados para la recuperación de ovocitos y el correcto criterio empleado para su selección;⁷¹ por lo que, las condiciones de transporte de ovarios juegan un papel importante sobre la calidad de ovocitos. Varias investigaciones realizadas tanto en alpacas como en bovinos, en producción *in vitro* de embriones, han transportado ovarios desde el matadero hasta el laboratorio, en SSF con antibióticos, a temperaturas de 30 a 37°C, por un periodo promedio de 3 a 10 h, sin llegar a afectar la calidad de los ovocitos en los procesos de MIV.^{7, 69-71} Sin embargo, debido a la lejanía geográfica que existe entre los mataderos y los laboratorios y a la necesidad de realizar estudios en esta área, sugieren realizar investigaciones sobre condiciones de transporte de ovarios de alpaca a diferentes temperaturas, sin que esta afecte la calidad de los ovocitos en los procesos de MIV. Es así que, una investigación preliminar realizada sobre la influencia de la temperatura de transporte (4°C - 35°C) sobre la calidad morfológica de ovocitos de alpaca, reportó que se obtuvieron 2,7% de ovocitos de calidad I, 33,33% de ovocitos de calidad II, 13,89% de ovocitos de calidad III y 50% de ovocito de calidad IV, cuando los ovocitos se transportaron a 4°C por espacio de 18 h y fueron recuperados utilizando el método de aspiración folicular.⁶⁵ La cantidad de ovocitos de calidad II obtenidos en la investigación anteriormente mencionada se asemeja a los resultados obtenidos en esta investigación (36,90 ± 5,70%), mientras que el resto difiere posiblemente por el método de recuperación de ovocitos empleado.

En la Tabla 3 y Figura 7, se muestra el porcentaje promedio de los ovocitos de alpaca aptos para la MIV, obteniendo 86,51% de ovocitos aptos (ovocitos de calidad I, II y III) y 13,49% de ovocitos no aptos (ovocitos de calidad IV). Muchos autores, en diversas investigaciones consideran que los ovocitos aptos para la MIV son los ovocitos de calidad I y II, debido a que presentan de dos a más capas de células del cúmulo y citoplasma homogéneo. Sin embargo, para la presente

investigación, debido a la poca cantidad de muestras y con la finalidad de realizar el cultivo en grupos grandes (>15 ovocitos/500 µl de medio para MIV); se han considerado también, aptas para la MIV ovocitos de calidad III, con la condición de que estas tengan por lo menos una capa de células de cúmulo completa y que su citoplasma sea homogéneo.

5.2. Evaluación del estadio nuclear de los ovocitos

La maduración de ovocitos, es una parte crucial del proceso de producción *in vitro* de embriones, debido a que está estrechamente relacionada con la continuidad de los procesos de manera escalonada (FIV y CIV) y de la adquisición y activación del genoma embrionario.³⁶ Diversos autores han considerado que un ovocito se encuentra maduro, cuando al ser evaluado mediante la técnica de fijación y tinción, se encuentra en el estadio nuclear de Metafase II o que exista la presencia del primer corpúsculo polar.^{5-7, 67, 70-71} Por lo que para determinar la tasa de maduración en la presente investigación, se estableció como criterio de maduración, a los ovocitos en Metafase II o que presenten el primer corpúsculo polar. En la Tabla 4 y Figura 8, se muestra las medias porcentuales de los estadios de maduración nuclear de ovocitos de alpaca (Figura 9), que fueron sometidos a cinco tratamientos, con dos tipos de factores de crecimiento en dos concentraciones diferentes. Los resultados indican que se obtuvo una media porcentual de ovocitos en VG igual a $0,69 \pm 2,41\%$, $2,08 \pm 5,18\%$, $0,76 \pm 2,62\%$, $4,85 \pm 9,72\%$ y $5,36 \pm 8,70\%$ para el tratamiento 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. La prueba de Kruskal-Wallis, indica que no existe diferencia significativa ($p>0,05$) de la cantidad de ovocitos en estadio de VG y los diferentes tratamientos con FC a los que fueron sometidos durante la MIV. No obstante, se puede observar que aparentemente la menor cantidad de ovocitos en estadio de vesícula germinal se encuentra en el tratamiento 1 (ovocitos que fueron madurados *in vitro* con 10 ng/ml de IGF-I); así mismo, con la prueba de Kruskal-Wallis no se han encontrado diferencias significativas ($p>0,05$), para las tasas de ovocito en Vesícula Germinal Rota y Mitosis I. Por otro lado, la prueba de ANOVA para la cantidad de ovocitos degenerados derivados de la MIV, tampoco ha encontrado diferencia significativa ($p>0,05$); sin embargo, aparentemente la menor cantidad de ovocitos degenerados se obtuvo con el tratamiento 1 ($21,83 \pm 17,80$). Estos resultados preliminares, permiten inferir que este tratamiento permite que la mayor cantidad de ovocitos transite a otro estadio de maduración nuclear durante el periodo de la MIV y se generen menor cantidad de ovocitos degenerados.

Por otro lado, la Tabla 5 muestra la tasa de maduración nuclear de ovocitos de alpaca, madurados *in vitro* con factores de crecimiento, los resultados indican que se obtuvieron las siguientes medias porcentuales de ovocitos en Metafase II: 61,81% $\pm$ 21,22; 50,28 $\pm$ 21,18%; 49,59 $\pm$ 18,70%; 52,86 $\pm$ 16,94% y 42,22 $\pm$ 16,56%, para los tratamientos 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Además, cabe indicar que, tras realizar la prueba de ANOVA a un nivel de confianza de 95%, no se han encontrado diferencias significativas ($p>0,174$); sin embargo, al realizar la prueba de Duncan se han encontrado que hay diferencia entre el tratamiento 5 (medio MIV sin FC) y el tratamiento 1 (medio MIV con 10 ng/ml de IGF-I), resultados que se pueden contrastar con la comparación de medianas y variabilidad de los datos que se muestran en la Figura 10.

Aunque en alpacas no se hayan reportado aún, ovocitos madurados con factores de crecimiento de manera independiente, existe evidencia de que se han utilizado EGF en el medio para la MIV, durante la producción *in vitro* de embriones; si bien, en los resultados no se muestran explícitamente los efectos sobre la tasa de maduración, este medio de maduración suplementado con FC mostró tener un efecto positivo y viable en la producción *in vitro* de embriones de alpaca.⁸ Por otro lado, en una investigación realizada en llamas, se logró obtener 74% de ovocitos en metafase II,⁹ resultados que superan a los que se obtuvo en nuestra investigación (61,81% con IGF-I a 10 ng/ml), esta diferencia podría estar marcada claramente por la combinación de factores de crecimiento (IGF-I y EGF a 10 ng/ml) que se utilizaron en dicha investigación, además de considerar la influencia sobre los resultados de la especie de Camélido Sudamericano en estudio, otros suplementos utilizados, condiciones de transporte, la recuperación y clasificación de ovocitos. No obstante, como ya se había mencionado anteriormente, la influencia de las condiciones de transporte, desempeñan un rol importante, no sólo en la calidad de los ovocitos; si no, que ésta también influye sobre la tasa de maduración nuclear de los ovocitos y el posterior desarrollo embrionario; debido a que, la competencia del ovocito de alpaca para la FIV se ve disminuida por las condiciones de transporte de ovarios, lo que se atribuye a que la membrana lipídica sufre cambios cuando se expone a temperaturas inferiores a 20°C; así como, lesiones del huso meiótico y endurecimiento de la zona pelúcida (estudio realizado en ovocitos de bovinos); sin embargo, la fase de transición lipídica no ha sido examinada para los ovocitos de alpaca.⁶⁷ lo que explica las bajas tasas de maduración nuclear en la presente investigación.

La incorporación de factores de crecimiento en los medios de maduración *in vitro*, ha sido muy poco estudiada en alpacas; siendo estudiada en su mayoría en bovinos; es así que, al utilizar EGF en concentraciones de 50 ng/ml lograron incrementar el porcentaje de ovocitos en metafase II ($81,4 \pm 4,2\%$),¹⁰ este resultado se muestra en un rango mayor que el encontrado en la presente investigación ($52,86 \pm 16,94\%$); así mismo, es inferior a la encontrada en otra investigación donde se obtuvo 73% de ovocitos en Metafase II.⁶ También se ha reportado que, al utilizar 10 ng/ml de EGF en el medio de maduración *in vitro*, se ha logrado obtener 54,2% de ovocitos en estadio de Metafase II,⁶ este resultado es similar al encontrado en la presente investigación ($49,59 \pm 18,70\%$), pero ambas resultan ser notablemente bajas al ser comparadas con otro estudio que reporta 87% de ovocitos en estadio de maduración nuclear de Metafase II. A partir de estos resultados se puede deducir que el EGF es capaz de promover la maduración nuclear de ovocitos en un medio químicamente definido. Por otro lado, aunque no se hayan encontrado reportes del efecto estimulador del IGF- I a concentraciones de 10 ng/ml y 50 ng/ml sobre la maduración nuclear de ovocitos, el presente estudio preliminar permite inferir que los ovocitos madurados con IGF- I a 10 ng/ml tienen una mejor maduración nuclear; sin embargo, dado al alcance de esta investigación y a la escasa información existente en esta especie, no es posible tener una explicación concluyente, pues se requieren futuras investigaciones que permitan aclarar los mecanismos fisiológicos y moleculares involucrados en este proceso.

5.3. Evaluación del desarrollo embrionario temprano *in vitro*

A parte de medir el efecto de los factores de crecimiento en el medio de MIV sobre la tasa de maduración nuclear; también, es necesario realizar la evaluación del desarrollo embrionario como una forma eficaz de comprobar si dicha maduración se produjo correctamente, lo que se verá reflejado en la capacidad de los ovocitos para ser fecundados *in vitro* y alcanzar con éxito las fases de división y desarrollo embrionario temprano.

En la presente investigación, la Tabla 6 y Figura 11 muestra el porcentaje promedio de los estadios de desarrollo embrionario temprano (Figura 15), con adición de FC al medio de MIV. La media porcentual de embriones segmentados (embriones con división de 2 a 4 células después de 7 días de cultivo post fecundación) fue de: $1,87 \pm 3,04\%$; $1,06 \pm 2,23\%$; $1,10 \pm 2,35\%$; $3,41 \pm 5,68\%$ y $0,83 \pm 2,64\%$ para los tratamientos 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Estos

resultados permiten inferir que, aparentemente, el desarrollo de embriones provenientes de ovocitos madurados sin factor de crecimiento (Tratamiento 5) presenta menores tasas de división embrionaria; por lo que, presentaría mayor tasa de embriones en estadíos más avanzados; sin embargo, los resultados indican que, respecto al estadío de mórulas este tratamiento presenta una media porcentual menor ($23,30 \pm 6,54\%$) en comparación con los otros tratamientos; $26,72\% \pm 11,26\%$; $30,12 \pm 11,00\%$; $32,01 \pm 11,35\%$ y $33,53 \pm 19,99\%$, para los tratamientos 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Además, cabe indicar que los ovocitos madurados en este tratamiento (sin FC), no han llegado a desarrollarse hasta el estadío de blastocisto y que, a la vez, este tratamiento presenta una mayor cantidad de embriones degenerados ($75,86 \pm 6,12\%$) respecto a los otros tratamientos. Estos resultados pueden explicarse, en base a estudios que han demostrado, que el uso de FC en los medios de cultivo utilizados para la producción *in vitro* de embriones, reduce de manera considerable la apoptosis celular, por lo que, en muchas investigaciones realizadas en bovinos, se emplean estos en los medios para la MIV, FIV y CIV; de manera independiente o en combinación de una con otra.¹¹

La prueba de Kruskal-Wallis para los porcentajes de embriones segmentados no difieren significativamente ($p > 0,05$) en los tratamientos empleados. Así mismo, la prueba de Kruskal-Wallis realizada al porcentaje de mórulas no encuentra diferencia significativa a un nivel de confianza de 95%, ($p > 0,05$); sin embargo, encuentra diferencia significativa a un nivel de confianza de 90% ($p < 0,10$), y al realizar la prueba de comparación de Bonferroni, se encontró que hay diferencia significativa entre el tratamiento 3 y 5 ($p = 0,8446$), Tabla 6. Estos resultados se pueden contrastar con la comparación de medianas y variabilidad de los datos que se muestran en la Figura 12. Por tanto, estos valores indican que el tratamiento 3 con EGF a 10ng/ml, permite obtener la mayor cantidad de mórulas, después de 7 días de cultivo *in vitro*.

Por otro lado, respecto a la media porcentual de blastocistos (Tabla 6), se obtuvo $7,88 \pm 4,05\%$; $6,72 \pm 4,79\%$; $6,18 \pm 5,19\%$; $5,48 \pm 5,44\%$ y 0, para los tratamientos 1, 2, 3, 4 y 5; respectivamente. El análisis estadístico de Kruskal-Wallis para los porcentajes de blastocistos difieren significativamente ($p < 0,05$) en los cinco tratamientos empleados; es así que al realizar la prueba de Bonferroni, se puede encontrar que existe diferencia significativa ($p = 0,0165$) entre el tratamiento 3 y 5; ($p = 0,0301$) entre el tratamiento 4 y 5. Así mismo, existe diferencia altamente

significativa ($p=0,0014$) entre los tratamientos 1 y 5; ($p=0,0078$) y entre los tratamiento 2 y 5. Estos resultados se pueden contrastar con la comparación de medianas y variabilidad de los datos que se muestran en la Figura 13. De estos resultados podemos deducir que la mayor cantidad de blastocistos se generan con el tratamiento 1 (10 ng/ml de IGF-I), seguido por el tratamiento 2 (IGF-I a 50 ng/ml) y por el tratamiento 3 (EGF a 10 ng/ml).

La media porcentual de blastocistos encontrada en este estudio resulta ser menor ($7,88 \pm 4,05\%$) que la encontrada en otra investigación realizada en alpacas donde utilizaron también 10 ng/ml de EGF en el medio para la MIV de ovocitos, donde reportan que después de 7 días el porcentaje de blastocistos fue de 14,21%.⁸ Aunque la formulación del medio de maduración haya sido similar, este resultado puede verse notablemente diferenciado debido a la calidad de ovocitos utilizados para la MIV ya que las condiciones de transporte de ovarios fueron diferentes. Otro estudio, realizado en bovinos reporta que al adicionar 10 ng/ml de EGF y 5 ng/ml de IGF-I, se obtienen $16,51 \pm 1,49\%$ de blastocistos al día 7.¹² Otra investigación similar a esta, también reportó que al evaluar la tasa de desarrollo hasta blastocistos fue de 24,4%.¹⁴ Al comparar estos resultados con los obtenidos en esta investigación, superan notablemente la tasa de blastocistos encontrados; diferencia que puede ser atribuida a la respuesta de los gametos de la especie en estudio, condiciones de transporte, formulación de medios de cultivo base para la MIV antes de ser suplementados con FC, condiciones de transporte de ovarios y a la combinación de factores de crecimiento.

La Tabla 7, muestra la tasa de desarrollo embrionario de alpaca en condiciones *in vitro* (media $\pm$ SD) y mediana, con adición de FC al medio para MIV. Los resultados obtenidos (mediana) indican que se ha encontrado 34,85%; 37,26%; 33,48%; 29,00% y 21,83% para los tratamientos 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. La cantidad de embriones encontrados en la presente investigación con el tratamiento 4 (29,00%) resulta ser menor que la encontrada por un estudio realizado en bovinos, donde se encontró $33,8 \pm 10,9 \%$ tras adicionar 50 ng/ml de EGF al medio de maduración. Sin embargo, lograron una cantidad mayor de embriones $30,7 \pm 3,5\%$, en el grupo control (sin factor de crecimiento) en comparación a los resultados de la presente investigación, donde se obtuvo 21,83% en el tratamiento 5 (sin FC).¹⁰ Por otro lado, otro estudio en bovinos reportó que al adicionar 10 ng/ml de EGF al medio de maduración logró obtener $34,77 \pm 1,64\%$ de embriones y $32,58 \pm 1,49\%$ para el grupo control.¹³ Diferencia que se atribuye a la respuesta

de los gametos de la especie en estudio, formulación de medios de cultivo base para la MIV antes de ser suplementados con FC y condiciones de transporte.

La prueba de Kruskal-Wallis para la tasa de embriones (Tabla 7), muestra que los resultados difieren significativamente ($p < 0,05$) en los cinco tratamientos empleados; es así que al realizar la Prueba de Bonferroni, se puede encontrar que existe diferencia significativa ($p = 0,0202$) entre los tratamientos 2 y 5 y ($p = 0,117$) entre los tratamientos 3 y 5. Estos resultados se pueden contrastar con la comparación de medianas y variabilidad de los datos que se muestran en la Figura 14. Por lo que el mejor tratamiento en el medio de maduración *in vitro*, con la finalidad de obtener la mayor tasa de embriones, es con la adición de IGF-I a 50 ng/ml (37,26%).

VI. CONCLUSIONES

1. En la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca, el Factor de Crecimiento Similar a la Insulina Tipo I (IGF-I) tuvo mejor efecto a una concentración de 10 ng/ml; mientras que, en el desarrollo embrionario *in vitro* el IGF-I tuvo mejor efecto a una concentración de 50 ng/ml.
2. La tasa de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca fue de: 61,81% con IGF-I a 10 ng/ml; 52,86% con EGF a 50 ng/ml; 50,28% con IGF-I a 50 ng/ml; 49,59% con EGF a 10 ng/ml y 42,22% sin FC.
3. La tasa de desarrollo embrionario *in vitro* de alpaca fue de: 37,26% con IGF-I a 50 ng/ml; 34,85% con IGF-I a 10 ng/ml; 33,48% con EGF a 10 ng/ml; 29,00% con EGF a 50 ng/ml y 21,83% sin FC.

VII. RECOMENDACIONES

1. Continuar con las investigaciones que involucren factores de crecimiento (EGF, IGF-I, TGF y PDGF) de manera individual y la combinación de estos, en la suplementación de medios de maduración y desarrollo embrionario, con el objetivo de estandarizar protocolos que incrementen la producción *in vitro* de embriones de alpacas.
2. Realizar investigaciones que permitan aclarar los mecanismos fisiológicos y moleculares involucrados en el proceso de maduración *in vitro* con factores de crecimiento.
3. Es importante controlar la esterilidad de los materiales y la asepsia del lugar de trabajo, para evitar pérdidas de la producción por causa de la contaminación.
4. Mantener la asepsia y desarrollar destreza durante la recuperación de espermatozoides a partir de los epidídimos, debido a que una ligera contaminación (restos de tejidos o sangre) en la muestra extraída puede ser causal de desencadenar el crecimiento de microorganismos en el medio durante el periodo de incubación, generando la eliminación de los cultivos.
5. Para desarrollar trabajos posteriores se debe de implementar en el laboratorio, un sistema automático de generador de energía, como respuesta ante la interrupción del fluido eléctrico.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quispe E, Mueller J, Ruiz J, Alfonso L, Gutiérrez G. Actualidades sobre adaptación, producción, reproducción y mejora genética en camélidos [libro electrónico]. Huancayo-Perú: Edición Gráfica Industrial E.I.R.L.; 2008 [citado 21 de mayo de 2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/277559441_Actualidades_sobre_adaptacion_produccion_reproduccion_y_mejora_genetica_en_camelidos
2. Huanca T, Gonzáles M, Cárdenas O, Mamani-Cato RH, Naveros M y Huanca W. INIA: Avances en transferencia de embriones en camélidos domésticos. En: XXXVII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Reproducción Animal. Abancay-Perú; 2014. p. 31-34. [Citado 17 de agosto de 2016]. Disponible en: <http://www.perulactea.com/2014/10/13/xxxvii-reunion-cientifica-anual-de-la-asociacion-peruana-de-produccion-animal-appa/>
3. Ruiz J. Estado de la producción de embriones *in vitro* en camélidos sudamericanos. *Spermova*. 2015;5(2):264-9.
4. Mamani GD. Métodos de selección espermática y tasa de fecundación *in vitro* en ovocitos de alpaca [Tesis Magistral]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina. Maestría en producción animal; 2015.
5. Santa Cruz C, Huanca W, Condori R y Ampuero A. Uso de macromoléculas sobre la tasa de maduración y desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos bovinos. *Rev Inv Vet Perú*. 2014;25(4):487-93.
6. Salgado R, Simanca J y Vergara O. Efecto del factor de crecimiento epidérmico (EGF) sobre la maduración de ovocitos bovinos cultivados *in vitro*. *Revista científica, FCV-LUZ*. 2013;23(4):325-8.
7. Huanca W, Condori R, Chileno M, García P, Cainzo J y Becerra J. Evaluación de cuatro tiempos de cultivo sobre la tasa de maduración y división posfecundación *in vitro* de ovocitos de alpaca. *Rev Inv Vet Perú*. 2014;25(4):468-76.
8. Gamarra G, Huaman E, León S, Carpio M, Alvarado E, Asparrin M, et al. 157 First *in vitro* embryo production in alpacas (*Lama pacos*). *Reprod Fertil Dev*. 2008;21(1):177-8.
9. Sansinena M, Taylor SA, Taylor PJ, Schmidt EE, Denniston R y Godke R. *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Anim Reprod Sci*. 2007;99:342-53.
10. Bernal BH. Influencia de la suplementación del medio de maduración y de cultivo en la supervivencia a la criopreservación de embriones bovinos *in vitro* [Internet] [Tesis Magistral]. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNC). Escuela para graduados; 2016. [Citado 10 de agosto de 2017]. Disponible en: <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/4609/Bernal%20Ballesteros.%20Influencia%20de%20la%20suplementaci%C3%B3n%20del%20medio%20>
11. Ahumada CJ. Efecto de diferentes factores de crecimiento en el medio de cultivo sobre el desarrollo y la calidad de embriones de bovino producidos *in vitro* en grupos reducidos [Tesis Magistral]. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. Máster Interuniversitario en Mejora Genética Animal y Biotecnología de la Reproducción; 2009.
12. Katchicualula A. Producción *in vitro* de embriones bovinos: efecto de la adicción combinada de los factores de crecimiento egf, igf-i, fgfb y pdgf en los medios de maduración de ovocitos y de cultivo embrionario [Internet] [Tesis doctoral]. León: Universidad de León; 2011. [Citado 10 de agosto de 2017]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=104822>

13. Álvarez E. Estudio de la influencia de los factores de crecimiento en la producción *in vitro* de embriones bovinos [Internet] [Tesis doctoral]. León: Universidad de León; 2009. [Citado 10 de agosto de 2017]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=26574>
14. Palomares R, Hernández H, Soto E, Gonzáles R, Ondiz A, Perea F, et al. Efecto del factor de crecimiento epidermal (EGF) durante la maduración de oocitos sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos. FCV-LUZ. 2004;14:162-7.
15. Volodymyr D. Efecto del factor de crecimiento epidérmico (EGF) sobre los procesos implicados en la fecundación "*in vitro*" [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de veterinaria; 2004.
16. Palma GA, Müller M and Brem G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*. J Reprod Fertil. 1997;110(2):347-53.
17. Lorenzo PL, Liu IKM, Illera JC, Picazo RA, Carneiro GF, Illera MJ, et al. Influence of epidermal growth factor on mammalian oocyte maturation via tyrosine-kinase pathway. J Physiol Biochem. 2001;57(1):15-22.
18. Mehlmann L, Jones T and Jaffe L. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. Science. 2002;297:143-1345.
19. Buccione R, Schroeder AC and Eppig JJ. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. Biol Reprod. 1990;43:543-7.
20. Dolci S, Williams DE, Ernest MK, Resnik JL, Brananan CO, Lock LF, et al. Requirements for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. Nature. 1991;352:809-11.
21. Mehlmann L. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. Reproduction. 2005;130:791-9.
22. Palma GA, Argañaraz ME, Barrera AD, Rodler D, Mutto AÁ and Sinowatz F. Biology and biotechnology of follicle development. Scientific World Journal. 2012;2012:938138.
23. Conti M, Andersen C, Richard F, Mehats C, Chun S, Horner K, et al. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. Mol Cell Endocrinol. 2002;187:153-9.
24. Kalinowski R, Berlot C, Jones T, Ross L and Mehlmann L. Maintenance of meiotic prophase arrest in vertebrate oocytes by a Gs protein-mediated pathway. Dev Biol. 2004;267:1-13.
25. Gigli I, Russo A and Agüero A. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. Rev In Vet Perú. 2006;8(1):183-204.
26. Hurk R and Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. Theriogenology. 2005;63:1717-51.
27. Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR and Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle. Biol Reprod. 1996;55:1187-94.
28. Diaz F, Wigglesworth K and Eppig J. Oocytes are required for the preantral granulosa cell cumulus cell transition in mice. Dev Biol. 2007;305:300.
29. Gilula N, Epstein M and Beers W. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. J Cell Biol. 1978;78:58-75.
30. Van Soom A, Tanghe S, De Pauw I, Maes D and De Kruif A. Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. Reprod Dom Anim. 2002;37:144-51.
31. Hunter M. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. Rev Reprod.

- 2000;5:122-30.
32. Apa R, Lanzone A, Miceli F, Mastrandea M, Caruso A, Mancuso A, et al. Growth hormone induces *in vitro* maturation of follicle- and cumulus- enclosed rat oocyte. *Mol Cell Endocrinol*. 1994;106:207-12.
 33. Conner S, Lefievre L, Hughe D and Barratt C. Cracking the egg: increased complexity in the zone pellucida. *Hum Reprod*. 2005;20:1148-52.
 34. Litscher E and Wassarman P. Extracellular coat proteins: from fish to mammals. *Histol Histopathol*. 2007;22:337-47.
 35. Wassarman P and Litscher E. Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida. *Int J Dev Biol*. 2008;52:665-76.
 36. Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA and Navarro AS. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 2009;71(5):836-48.
 37. Picton M, Harris S, Muruvi W and Chambers E. The *in vitro* growth and maturation of follicle. *Reproduction*. 2008;136:703-15.
 38. Lattanzi ML. Regulación de la maduración de ovocitos por factores paracrinós [Internet] [Tesis doctoral]. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química Biológica; 2009. [citado 16 de agosto de 2017]. Disponible en: http://digital.bl.fcen.uba.ar/gsd-282/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=tesis&d=Tesis-4682_Lattanzi
 39. Villamediana P. Embriones caprinos producidos *in vitro*: estudio citogenético y ultraestructural de ovocitos madurados y fecundados *in vitro*. [Tesis]. España: Universidad Autónoma de Barcelona; 1998.
 40. Gospodarowicz D and Moran JS. Growth factors in mammalian cell culture. *Annu Rev Biochem*. 1976;45:531-58.
 41. Block J, Fisher-Brown A, Rodina T, Ealy A and Hansen P. The effect of *in vitro* treatment of bovine embryos with IGF-I on subsequent development *in utero* to day 14 of gestation. *Theriogenology*. 2007;68:153-61.
 42. Hill DJ. Growth factors and their cellular actions. *J Reprod Fertil*. 1989;85:723-34.
 43. Carpenter G and Cohen S. Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem*. 1979;48:193-216.
 44. Carpenter G. Epidermal Growth Factor. En: *Tissue Growth Factors* [Libro electrónico]. Springer, Berlin, Heidelberg; 1981 [citado 4 de noviembre de 2017]. p. 89-132. (Handbook of Experimental Pharmacology). Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-67986-5_3
 45. Schlessinger J. The Epidermal Growth Factor Receptor as a Multifunctional Allosteric Protein. *American Chemical Society*. 1988;27(9):3119-23.
 46. Ushiro H and Cohen S. Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J Biol Chem*. 1980;255(18):8363-5.
 47. Boonstra J, Rijken P, Humbel B, Cremers F, Verkleij A, Van B and Henegouwen P. The epidermal growth factor. *Cell Biol Int*. 1995;19(5):413-30.
 48. Tarnawski AS and Jones MK. The role of epidermal growth factor (EGF) and its receptor in mucosal protection, adaptation to injury, and ulcer healing: involvement of EGF-R signal transduction pathways. *J Clin Gastroenterol*. 1998;27 Suppl 1:S12-20.
 49. Drobchak V, Cordova A, Mayenco AM, Sanchez de la Muela M, García-Botey C and Pérez JF. Inmunolocalización del factor transformante del crecimiento (TGF α) y su receptor (EGFr) en la próstata y en el testículo de perro. En: III Congreso Ibérico de Reproducción Animal. Oporto; 2001.

50. Downs S. Specificity of Epidermal Growth Factor Action on Maturation of the Murine Oocyte and Cumulus Oophorus *in vitro*. Biol of reprod. 1989;41:371-379.
51. Rinderknecht E and Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. J Biol Chem. 1978;253(8):2769-76.
52. Svoboda ME and VanWyk JJ. Purification of somatomedin-C/insulin-like growth factor I. Methods Enzymol. 1985;109:798-816.
53. Rechler MM, Nissley SP. Insulin-Like Growth Factors. En: Peptide Growth Factors and Their Receptors I [Libro electrónico]. Springer, New York, NY; 1991 [citado 11 de noviembre de 2017]. p. 263-367. (Springer Study Edition). Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-3210-0_6
54. Schmid C. Insulin-like growth factors. Cell Biol Int. 1995;10(5):445-58.
55. LeRoith D, McGuinness M, Shemer J, Stannard B, Lanau F, Faria TN, et al. Insulin-Like Growth Factors. Neurosignals. 1992;1(4):173-81.
56. Hsu CJ, Hammond JM. Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin-like growth factor-I production by porcine granulosa cells *in vitro*. Endocrinology. 1987;120(1):198-207.
57. Demeestere I, Gervy C, Centner J, Devreker F, Englert Y and Delbaere A. Effect of Insulin-Like Growth Factor-I During Preantral Follicular Culture on Steroidogenesis, *In Vitro* Oocyte Maturation, and Embryo Development in Mice. Biol Reprod. 2004;70(6):1664-9.
58. Hammond JM, Baranao JL, Skaleris D, Knight AB, Romanus JA and Rechler MM. Production of insulin-like growth factors by ovarian granulosa cells. Endocrinology. 1985;117(6):2553-5.
59. Xia P, Tekpetey FR and Armstrong DT. Effect of IGF-I on pig oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development *in vitro*, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity. Mol Reprod Dev. 1994;38(4):373-9.
60. Herrler A, Lucas-Hahn A, Niemann H. Effects of insulin-like growth factor-I on *in vitro* production of bovine embryos. Theriogenology. 1992;37(6):1213-24.
61. Sarzosa MS y Culcay IH. Evaluación de la producción *in vitro* de embriones de alpaca (*Vicugna pacos*) en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi [Tesis]. Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi. Carrera de Medicina Veterinaria; 2014.
62. Ruiz J, Correa J. Maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca y llama aspirados vía laparoscopia. En: I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica; 2007.
63. Ratto M, Berland M, Huanca W, Singh J and Adams G. *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes. Theriogenology. 2005;63:2445-57.
64. Huanca W, Condori R, Cainzo J, Chileno M, Quintela L, Becerra J, et al. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of alpaca (*Vicugna Pacos*) oocytes: Effect of time of incubation on nuclear maturation and cleavage. Reprod Fertil Dev. 2009;22(1):327-327.
65. Huanca W, Palomino JM, Cervantes M, Cordero A y Huanca T. Efecto de temperaturas de transporte (35°C,4°C) sobre la calidad morfológica de ovocitos colectados desde ovarios de alpacas. En: APPA -ALPA. Cusco-Perú; 2007.
66. Vasquez NF, Perez MG, Olivera LV y Perez UH. Efecto de dos métodos de colección sobre la cantidad y calidad ovocitaria de alpaca (*Vicugna pacos*) y llamas (*Lama glama*) *post mórtem*. Rev Investig Altoandin. 2015;17(3):331-40.

67. Arriaga I, Huanca W, Terreros M, Becerra J, García P y Ampuero A. Efecto de temperatura y tiempo de almacenamiento de ovarios de alpacas sobre la tasa de maduración y división *in vitro* de ovocitos. Rev Inv Vet Perú. 2014;25(4):477-86.
68. Katska L and Smorag Z. The influence of culture temperature on *in vitro* maturation of bovine oocytes. Anim Reprod Sci. 1985;9:205-12.
69. Gomez OE, Choque D, Henao F, Escobedo MH and Velarde N. Comparación de tres métodos de recuperación de Complejos Ovocito-Cúmulus (COCs) de alpaca recuperados de ovarios postmortem en un Camal. Spermova. 2013;3(1):103-4.
70. Contreras M. Evaluación de la calidad de embriones producidos por fertilización *in vitro* en alpacas (Vicugna pacos) [Tesis]. Ayacucho-Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad de Ciencias Agrarias; 2014.
71. Santayana PC. Tiempo de maduración de ovocitos Vicugna pacos «alpaca» en el desarrollo embrionario por fecundación *in vitro*, Huancavelica [Tesis Pregrado]. Ayacucho-Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad de Ciencias Biológicas; 2011.
72. Trasorras L. Producción de embriones *in vivo* e *in vitro* en camélidos sudamericanos. Spermova. 2012;2(1):10-21.
73. Leibfried L and First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. J Anim Sci. 1979;48(1):76-86.
74. Xu P, Oreve T, Smith S and Hyttel P. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation *in vitro*. Acta Vet Scand. 1986;27:505-19.
75. Nagao Y, Saeki K, Hoshi M and Nagai M. Early development of bovine embryos. J Reprod Dev. 1985;41(5):129-36.
76. Loos F, Van Vliet C, Van Maurik P and Kruip A. Morphology of immature bovine oocytes. Gamete Res. 1989;24(2):197-204.
77. Herrera LV, Jara OO. Comparación de dos suplementos para maduración de ovocitos ovinos *in vitro* [Tesis]. Bogotá: Universidad de la Salle. Facultad de Medicina Veterinaria; 2009.
78. San Martín M, Copaira M, Zúñiga J, Rodríguez R, Bustinza G and Acosta L. Aspects of reproducción in the alpaca. J Reprod Fertil. 1968;16:395-9.
79. Palma GA. Biotecnología de la reproducción. Primera Edición. INTA Argentina: Gustavo Palma; 2001. 225-282 p.
80. Lu KH, Gordon I, Gallagher M and McGovern H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilisation of oocytes matured *in vitro*. Vet Rec. 1987;121(11):259-60.
81. Lenz R, Ball G, Leibfried M, Ax R and First N. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature dependent processes. Biol Reprod. 1983;29:173-9.
82. Sato E, Iritani A and Nishikawa Y. Factors involving in maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured *in vitro*. Jap J Anim Reprod. 1977;23:12-8.
83. Del Campo M, Del Campo C, Donoso M, Berland M and Mapletoft R. *In vitro* fertilization and development of Llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. Theriogenology. 1994;41:1219-29.
84. Brackett B and Zuelke K. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. Theriogenology. 1993;39:43-64.
85. Fukui Y and Ono H. 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. 1989;86:501-6.
86. Eppig J, Freter R, Ward-Bailey P and Schultzz R. Inhibition of oocyte maturation in the mouse: participation of cAMP, steroid hormones, and a

- putative maturation-inhibitor factor. Dev Biol. 1983;100:39-49.
87. Fukui Y, Fukushima M, Terawaki Y and Ono H. Effect of gonadotropin, steroids and culture media on bovine oocyte maturation. Theriogenology. 1982;18:161-75.
 88. Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. 1°. Cambridge: Inglaterra: CAB internacional; 1994.
 89. Iritani A. Micromanipulation of gametes for *in vitro* assisted fertilization. Mol Reprod Dev. 1991;28(2):199-207.
 90. Avery B and Greve T. Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for *in vitro* insemination. Theriogenology. 1995;44(6):871-8.
 91. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH and First NL. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology. 1986;25(4):591-600.
 92. Hafez E. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7.^a ed. España: MC Graw Hill; 2002.
 93. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA. Memoria técnica curso de graduación: Producción *in vitro* y criopreservación de embriones bovinos. Argentina, Balcarce; 2010.
 94. Hamano S, Kuwayana M. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method. Theriogenology. 1993;39:703-12.

ANEXOS

Anexo 1. Composición de los medios de cultivos utilizados en la producción *in vitro* de embriones de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

Tabla 8. Composición de la solución salina fisiológica 0.9% con gentamicina.

Componente	Cantidad
Solución salina fisiológica 0,9%	1 L
Gentamicina 80 mg/ml	1 ml

Tabla 9. Composición del medio de manipulación.

Componente	Cantidad
TCM - HEPES	90 ml
SFB	10 ml
Gentamicina 80 mg/ml	100 µl

Tabla 10. Composición del medio de maduración (MM).

Componente	Cantidad
TCM - 199	4,5 ml
SFB	0,5 ml
Piruvato de Sodio	30 µl
FSH	25 µl
LH	25 µl
L-Glutamina	10 µl
17-β estradiol	5 µl
Gentamicina 80 mg/ml	5 µl

Tabla 11. Composición del medio de maduración suplementado con FC.

Componente	Cantidad µl/ml
MM + EGF (10 ng/ml)	1 µl
MM + EGF (50 ng/ml)	1 µl
MM + IGF-I (10 ng/ml)	1 µl
MM + IGF-I (50 ng/ml)	1 µl

Tabla 12. Composición del medio de fertilización.

Componente	Cantidad
TAL – FIV BASE	10 ml
Piruvato de Sodio	100 µl
Heparina	10 µl
Gentamicina 80 mg/ml	10 µl
BSA-FAC-V	0,03 g

Tabla 13. Composición del medio de cultivo SOF.

Componente	Cantidad
SOF - BASE	10 ml
Aminoácidos esenciales	200 µl
Aminoácidos no esenciales	100 µl
SFB	200 µl
Myoinositol	100 µl
Piruvato de sodio	40 µl
L-Glutamina	20 µl
Ácido cítrico	10 µl
Gentamicina 80 mg/ml	10 µl
BSA-FAC-V	0,03 g

Anexo 2. Soluciones stock necesarias para la preparación de los diferentes medios utilizados en la producción *in vitro* de embriones de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

Tabla 14. L-Glutamina

Componente	Cantidad
L-Glutamina	0,146 g
Agua milli-Q	10 ml
Separar en alícuotas de 20 y 200 µl y congelar	

Tabla 15. Piruvato de Sodio

Componente	Cantidad
Piruvato de Sodio	0,11 g
Agua milli-Q	10 ml
Separar en alícuotas de 50 y 100 µl y congelar	

Tabla 16. Myoinositol

Componente	Cantidad
Myoinositol	0,5 g
Agua milli-Q	10 ml
Separar en alícuotas de 120 µl y congelar	

Tabla 17. 17-β Estradiol

Componente	Cantidad
17-β Estradiol	0,002 g
Agua milli-Q	10 ml
Separar en alícuotas de 10 µl y congelar	

Tabla 18. Ácido cítrico

Componente	Cantidad
Ácido cítrico	1 g
Agua milli-Q	10 ml
Separar en alícuotas de 15 µl y congelar	

Tabla 19. FSH

Componente	Cantidad
FSH	0,005 g
Agua milli-Q	10 ml
Separar en alícuotas de 30 µl y congelar	

Tabla 20. LH

Componente	Cantidad
LH	0,005 g
Agua milli-Q	10 ml
Separar en alícuotas de 30 μ l y congelar	

Anexo 3. Proceso de la preparación de soluciones stock para la producción *in vitro* de embriones de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)



a) Pesado de reactivos para soluciones stock.



b) Agitación en Vórtex para disolver los reactivos.

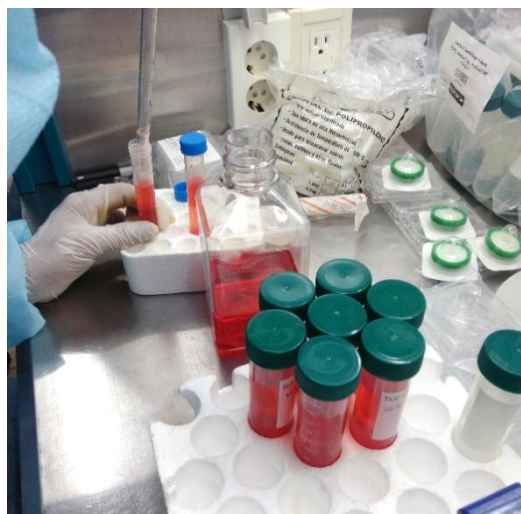


c) Distribución de alícuotas de las soluciones en tubos eppendorf.



Congelación a -20 °C

Anexo 4. Proceso de la preparación de medios de cultivo para la producción *in vitro* de embriones de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)



a) Distribución del medio TCM-199 en tubos falcón y descongelación de medios base.



b) Adición de alícuotas a los medios de cultivo.



c) Homogenización de los medios de cultivo con ayuda del Vórtex.



d) Filtración de medios de cultivo con filtros de 0,22 μm de diámetro.



e) Distribución de medios de cultivo en placas Well multipocillo y placas de Petri.



f) Acondicionamiento de medios de cultivo en la incubadora de CO₂ (1 o 2 h).

Anexo 5. Flujograma de la producción *in vitro* de embriones de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)

Figura 15. Flujograma de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca

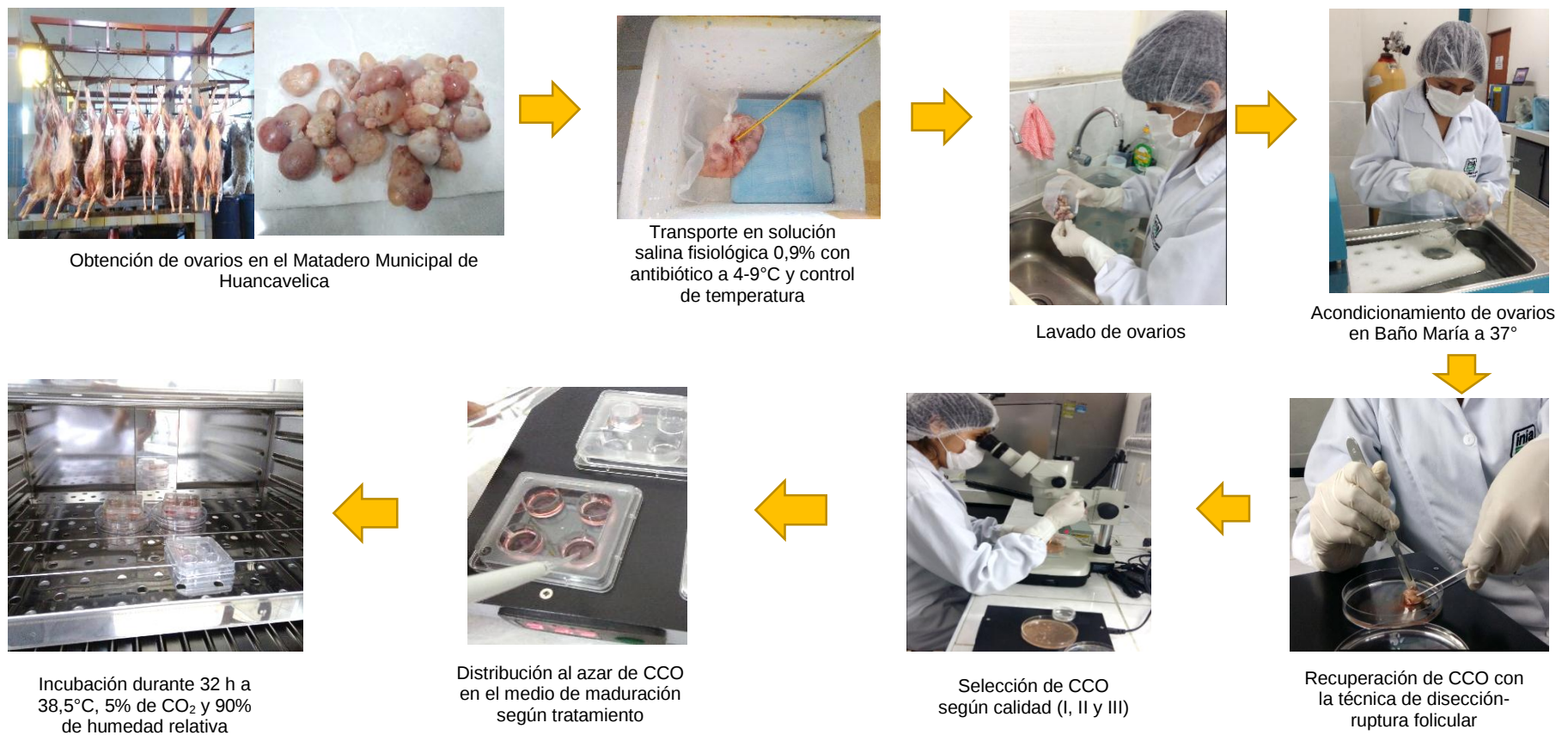


Figura 16. Flujograma de fecundación *in vitro* de ovocitos de alpaca

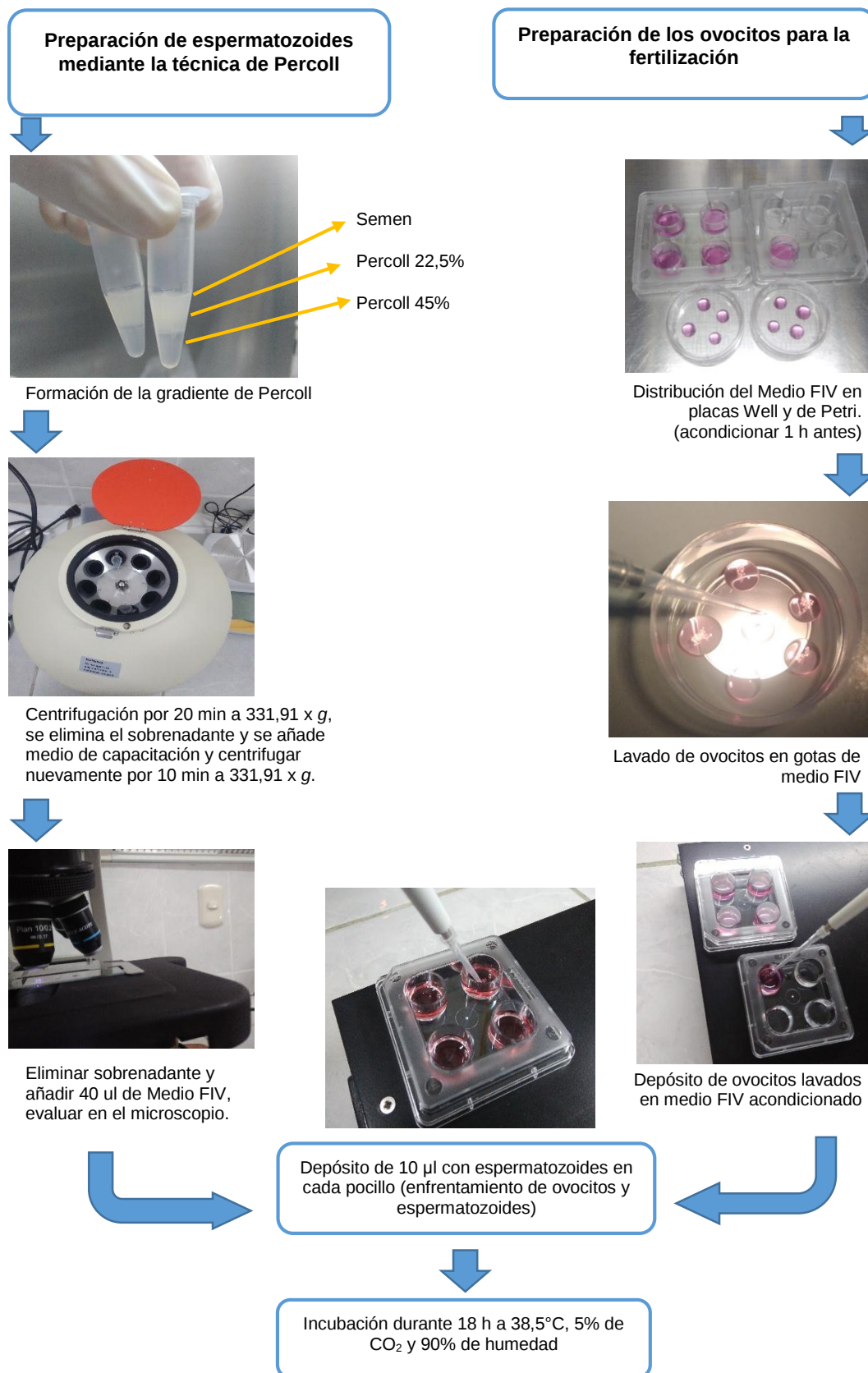
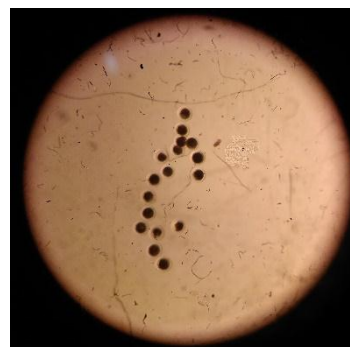


Figura 17. Flujograma de cultivo *in vitro* de presuntos cigotos de alpaca



Denudación de presuntos cigotos por aspiración repetida de volúmenes de 100 μ l.



Presuntos cigotos después de la denudación.



Lavado de los presuntos cigotos en gotas con medio SOF.



Depósito de los presuntos cigotos en medio SOF acondicionado.



Placas Well en bolsa de polietileno con mezcla de gases CO₂ (5%), O₂ (5%) y N₂ (5%)

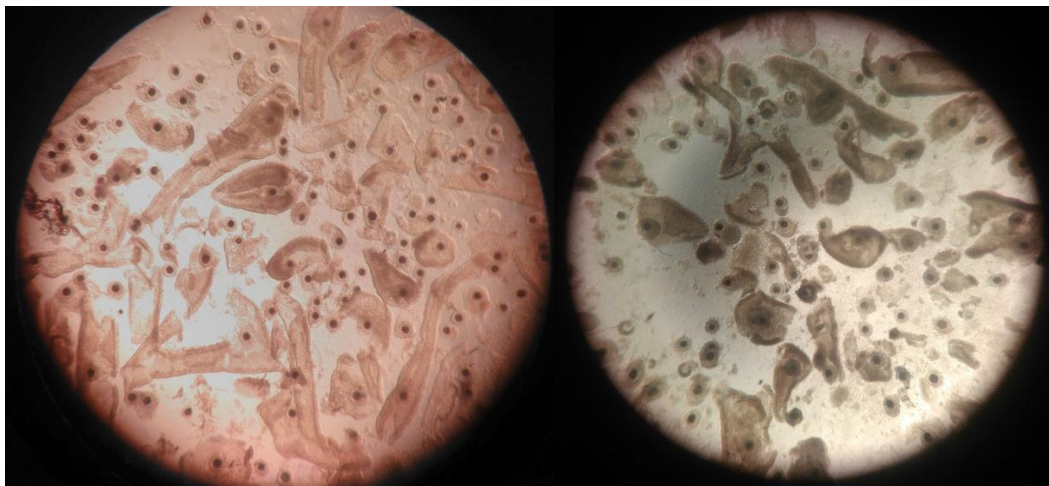


Evaluación de embriones

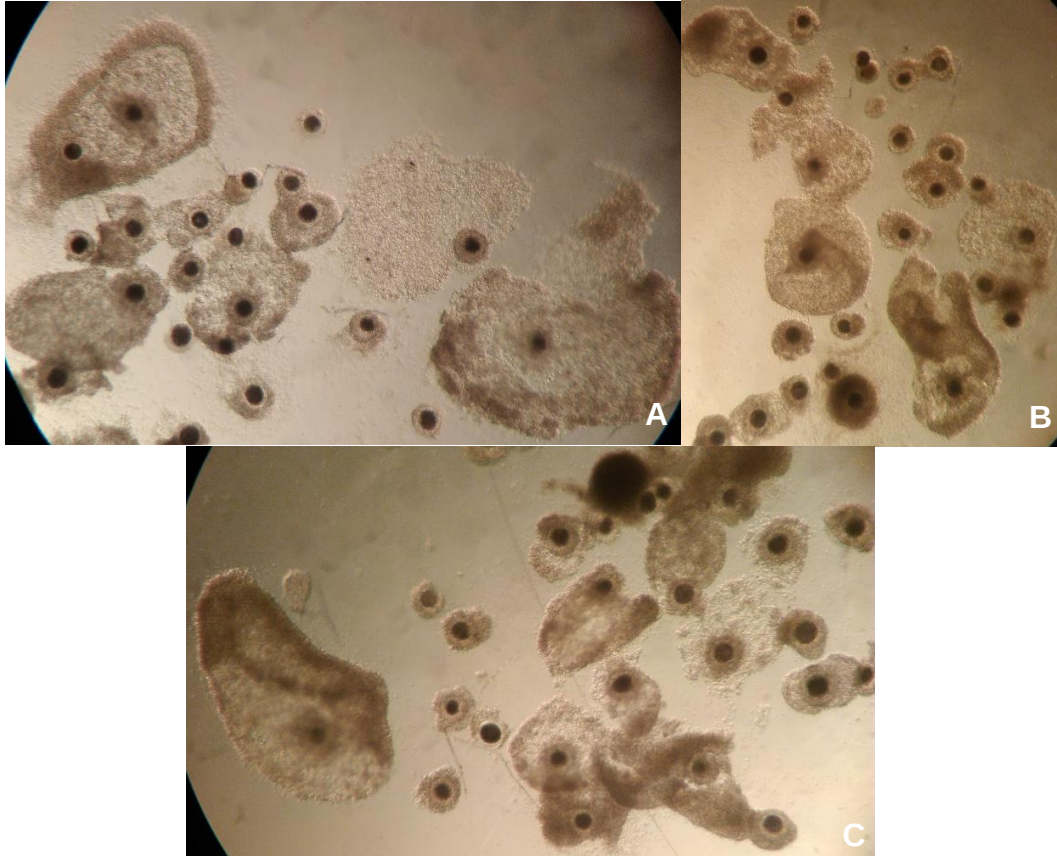


Incubación durante 7 días a 38,5°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa

Anexo 6. Ovocitos de alpaca recuperados mediante la técnica de disección-ruptura folicular. Estereoscopio (Motic, SMZ-168). Objetivo 20X. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)



Anexo 7. Ovocitos de alpaca madurados con factores de crecimiento. Estereoscopio (Motic, SMZ-168). Objetivo 30X. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacacucho (enero - setiembre, 2017)

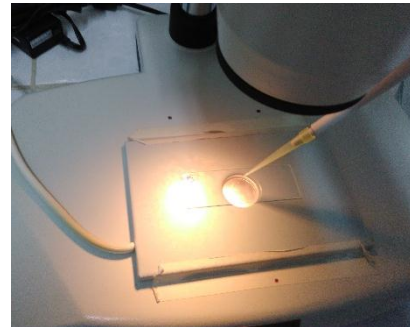


(A) Ovocitos madurados con IGF-I a 10 ng/ml; (B) Ovocitos madurados con EGF 50 ng/ml y (C) Ovocitos madurados con IGF-I a 50 ng/ml.

Anexo 8. Proceso de tinción de ovocitos de alpaca, con orceína acética al 2%. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacacucho (enero - setiembre, 2017)



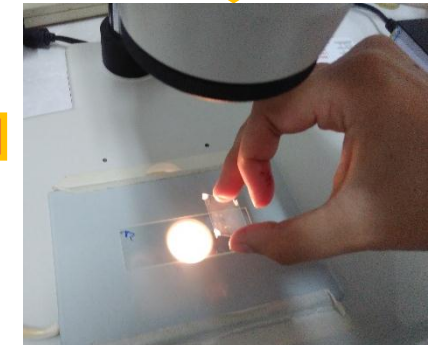
Fijación de ovocitos con metanol y ácido acético (3:1) durante 36 h a 4°C



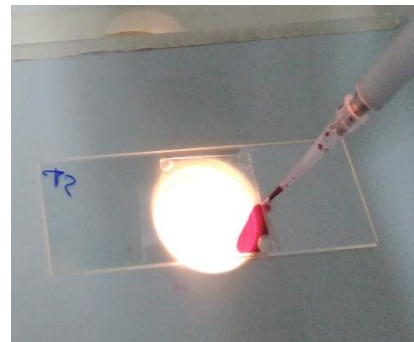
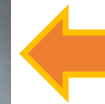
Recuperación y depósito de ovocitos en portaobjetos



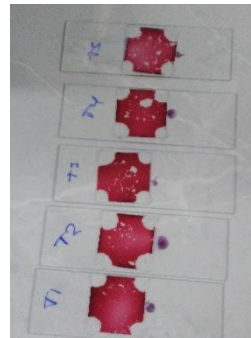
Incorporación de vaselina en las esquinas del cubreobjetos



Montaje de los ovocitos con el cubreobjetos



Adición de orceína acética al 2%

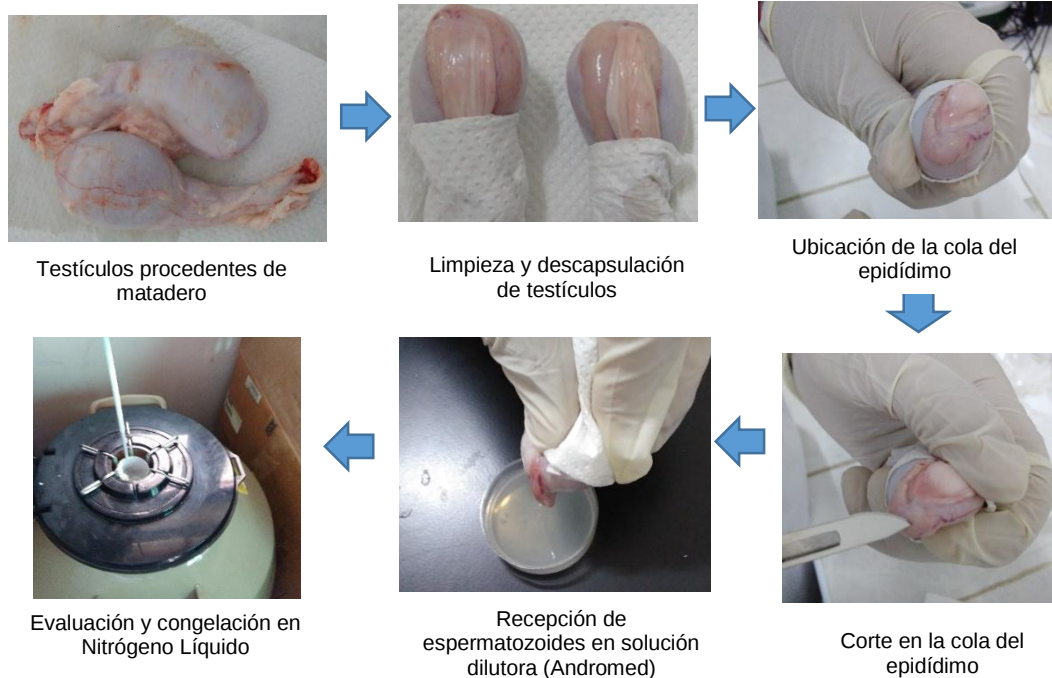


Reposo durante 15 min antes de la evaluación



Evaluación de ovocitos, Microscopio óptico (ACCUSCOPE), Objetivo 40X

Anexo 9. Proceso de recuperación de espermatozoides de alpaca a partir de epidídimos de testículos procedentes de matadero. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (enero - setiembre, 2017)



Anexo 10. Análisis de varianza de la tasa de maduración nuclear de ovocitos de alpaca. Ayacucho, noviembre 2017

Fuente	GL	SC	CM	F	Valor p
Tratamiento	4	2392	598	1,65	0,174
Error	55	19911	362		
Total	59	22302			

Anexo 11. Análisis de comparación múltiple de la tasa de maduración nuclear de ovocitos de alpaca, prueba de Duncan a un nivel de confianza de 95%. Ayacucho, noviembre 2017

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
T5	12	42,2192	
T3	12	49,5867	49,5867
T2	12	50,2783	50,2783
T4	12	52,8608	52,8608
T1	12		61,8100
Sig.		,219	,157

Anexo 12. Análisis de varianza de la tasa de ovocitos degenerados de alpaca, después de la maduración *in vitro*. Ayacucho, noviembre 2017

Fuente	GL	SC	CM	F	Valor p
Tratamiento	4	760	190	0,43	0,784
Error	55	24078	438		
Total	59	24838			

Anexo 13. Análisis de comparación múltiple de ovocitos degenerados de alpaca, después de la maduración *in vitro*, prueba de Duncan a un nivel de confianza de 95%. Ayacucho, noviembre 2017

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0,05
		1
T1	12	21,8250
T4	12	26,6958
T5	12	27,8400
T2	12	30,6183
T3	12	32,0967
Sig.		,293

Anexo 14. Prueba de Kruskal-Wallis para los porcentajes promedio de ovocitos de alpaca en estadio de Vesícula Germinal (VG) después de la maduración *in vitro*. Ayacucho, noviembre 2017

Chisq	Df	p.chisq
4,941585	4	0,293344

Anexo 15. Prueba de Kruskal-Wallis para los porcentajes promedio de ovocitos de alpaca en estadio de Vesícula Germinal Rota (VGBD) después de la maduración *in vitro*. Ayacucho, noviembre 2017

Chisq	Df	p.chisq
4,878843	4	0,2999564

Anexo 16. Prueba de Kruskal-Wallis para los porcentajes promedio de ovocitos de alpaca en estadio de Mitosis I (MI) después de la maduración *in vitro*. Ayacucho, noviembre 2017

Chisq	Df	p.chisq
2,057119	4	0,7252539

Anexo 17. Prueba de Kruskal-Wallis para los porcentajes promedio de embriones de alpaca segmentados, después del cultivo *in vitro* de embriones. Ayacucho, noviembre 2017

Chisq	Df	p.chisq
1,994655	4	0,7367421

Anexo 18. Prueba de Kruskal-Wallis para los porcentajes promedio de mórulas de alpaca, después del cultivo *in vitro* de embriones. Ayacucho, noviembre 2017

Chisq	Df	p.chisq
3,898296	4	0,419945

Anexo 19. Prueba de Bonferroni para los porcentajes promedio de mórulas de alpaca, después del cultivo *in vitro* de embriones, a un nivel de confianza de 90%. Ayacucho, noviembre 2017

Tratamientos	MOR	Rango	n	Min	Max	Q25	Q50	Q75
T1	26,722	23,5	10	9,09	43,75	18,6350	27,525	31,2500
T2	30,120	28,8	10	10,53	50,00	25,6950	31,370	35,1150
T3	32,007	30,4	10	21,43	58,33	23,2975	29,285	37,1775
T4	33,525	25,9	10	12,00	58,33	17,7825	23,215	56,2475
T5	23,304	18,9	10	16,67	35,00	17,7650	21,825	25,0000

Comparación:

Grupos	Diferencia	Valor p	Signif.	LCL	UCL
T1 – T2	-5,3	1,0000		-24,541478	13,94148
T1 – T3	-6,9	1,0000		-26,141478	12,34148
T1 – T4	-2,4	1,0000		-21,641478	16,84148
T1 – T5	4,6	1,0000		-14,641478	23,84148
T2 – T3	-1,6	1,0000		-20,841478	17,64148
T2 – T4	2,9	1,0000		-16,341478	22,14148
T2 – T5	9,9	1,0000		-9,341478	29,14148
T3 – T4	4,5	1,0000		-14,741478	23,74148
T3 – T5	11,5	0,8446	*	-7,741478	30,74148
T4 – T5	7,0	1,0000		-12,241478	26,24148

Anexo 20. Prueba de Kruskal-Wallis para los porcentajes promedio de blastocistos de alpaca, después del cultivo *in vitro* de embriones. Ayacucho, noviembre 2017

Chisq	Df	p.chisq
15,84847	4	0,003229384

Anexo 21. Prueba de Bonferroni para los porcentajes promedio de blastocistos de alpaca, después del cultivo *in vitro* de embriones a un nivel de confianza de 95%. Ayacucho, noviembre 2017

Tratamientos	BLA	Rango	n	Min	Max	Q25	Q50	Q75
T1	7,880	32,65	10	4,55	18,18	5,7325	6,25	8,6025
T2	6,715	29,60	10	0,00	15,79	5,1400	6,51	8,1700
T3	6,185	28,20	10	0,00	14,29	1,1375	6,83	8,1700
T4	5,475	27,05	10	0,00	16,00	0,0000	6,50	8,3300
T5	0,00	10,00	10	0,00	0,00	0,0000	0,00	0,0000

Comparación:

Grupos	Diferencia	Valor p	Signif.	LCL	UCL
T1 – T2	3,05	1,0000		-12,998079	19,09808
T1 – T3	4,45	1,0000		-11,598079	20,49808
T1 – T4	5,60	1,0000		-10,448079	21,64808
T1 – T5	22,65	0,0014	**	6,601921	38,69808
T2 – T3	1,40	1,0000		-14,648079	17,44808
T2 – T4	2,55	1,0000		-13,498079	18,59808
T2 – T5	19,60	0,0078	**	3,551921	35,64808
T3 – T4	1,15	1,0000		-14,898079	17,19808
T3 – T5	18,20	0,0165	*	2,151921	34,24808
T4 – T5	17,05	0,0301	*	1,001921	33,09808

Anexo 22. Prueba de Kruskal-Wallis para los porcentajes promedio de embriones de alpaca, después del cultivo *in vitro*. Ayacucho, noviembre 2017

Chisq	Df	p.chisq
12,80154	4	0,01228731

Anexo 23. Prueba de Bonferroni para los porcentajes promedio de embriones de alpaca, después del cultivo *in vitro* a un nivel de confianza de 95%. Ayacucho, noviembre 2017

Tratamientos	EMB	Rango	n	Min	Max	Q25	Q50	Q75
T1	34,601	27,20	10	22,73	50,00	26,5575	34,845	37,5000
T2	36,837	30,25	10	23,53	50,00	30,8325	37,255	42,5625
T3	38,191	31,35	10	27,27	58,33	29,7225	33,480	45,0300
T4	39,001	27,60	10	17,65	66,67	24,8175	29,00	58,3300
T5	23,304	11,10	10	16,67	35,00	17,7650	21,825	25,0000

Comparación:

Grupos	Diferencia	Valor p	Signif.	LCL	UCL
T1 – T2	-3,05	1,0000		-20,2921527	14,19215
T1 – T3	-4,15	1,0000		-21,3921527	13,09215
T1 – T4	-0,40	1,0000		-17,6421527	16,84215
T1 – T5	16,10	0,0841	.	-1,1421527	33,34215
T2 – T3	-1,10	1,0000		-18,3421527	16,14215
T2 – T4	2,65	1,0000		-14,5921527	19,89215
T2 – T5	19,15	0,0202	*	1,9078473	36,39215
T3 – T4	3,75	1,0000		-13,4921527	20,99215
T3 – T5	20,25	0,0117	*	3,0078473	37,49215
T4 – T5	16,50	0,0702	.	-0,7421527	33,74215

Anexo 24. Prueba de Kruskal-Wallis para los porcentajes promedio de embriones degenerados de alpaca, después del cultivo *in vitro* de embriones. Ayacucho, noviembre 2017

Chisq	Df	p.chisq
15,59805	4	0,003608791

Anexo 25. Prueba de Bonferroni para los porcentajes promedio de embriones degenerados de alpaca, después del cultivo *in vitro* de embriones. Ayacucho, noviembre 2017

Tratamientos	DEG	Rango	n	Min	Max	Q25	Q50	Q75
T1	63,534	24,50	10	42,86	77,27	57,8125	65,155	71,6525
T2	62,107	21,25	10	50,00	76,47	57,4375	59,965	66,2525
T3	60,708	20,35	10	41,67	72,73	54,9700	63,395	69,1675
T4	57,595	19,95	10	33,33	72,73	41,6700	66,145	70,4425
T5	75,863	41,45	10	65,00	83,33	75,0000	76,390	78,8550

Comparación:

Grupos	Diferencia	Valor p	Signif.	LCL	UCL
T1 – T2	3,25	1,0000		-13,31394	19,8139439
T1 – T3	4,15	1,0000		-12,41394	20,7139439
T1 – T4	4,55	1,0000		-12,01394	21,1139439
T1 – T5	-16,95	0,0415	*	-33,51394	-0,3860561
T2 – T3	0,90	1,0000		-15,66394	17,4639439
T2 – T4	1,30	1,0000		-15,26394	17,8639439
T2 – T5	-20,20	0,0079	**	-36,76394	-3,6360561
T3 – T4	0,40	1,0000		-16,16394	16,9639439
T3 – T5	-21,10	0,0049	**	-37,66394	-4,5360561
T4 – T5	-21,50	0,0039	**	-38,06394	-4,9360561

Anexo 26. Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
Efecto de factores de crecimiento sobre la tasa de maduración de ovocitos y desarrollo embrionario <i>in vitro</i> de alpaca.	¿Cuál es el efecto de los factores de crecimiento a diferentes concentraciones en la inducción de la maduración de ovocitos de alpaca y posterior desarrollo embrionario <i>in vitro</i> ?	GENERAL: • Evaluar el efecto de dos factores de crecimiento: Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) y Factor de Crecimiento Similar a la Insulina Tipo I (IGF-I) en diferentes concentraciones, sobre la tasa de maduración de ovocitos y posterior desarrollo embrionario <i>in vitro</i> de <i>Vicugna pacos</i> "alpaca". ESPECÍFICOS: • Determinar el tipo y concentración de factores de crecimiento para lograr la mayor tasa de maduración de ovocitos y desarrollo embrionario <i>in vitro</i> de "alpaca". • Determinar la tasa de ovocitos maduros <i>in vitro</i>, inducida con factores de crecimiento. • Determinar la tasa de desarrollo embrionario <i>in vitro</i> de "alpaca" a partir de ovocitos madurados con factores de crecimiento.	ANTECEDENTES • Fisiología ovárica • Ovogénesis • Foliculogénesis • Ovocito • Maduración del ovocito • Factores de crecimiento • Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) • Factor de Crecimiento Similar a la Insulina Tipo I (IGF-I) • Producción <i>in vitro</i> de embriones.	H₀: A diferentes concentraciones de factor de crecimiento no habrá incremento en la tasa de maduración de ovocitos y desarrollo embrionario. H_a: A diferentes concentraciones de factor de crecimiento habrá incremento en la tasa de maduración de ovocitos y desarrollo embrionario.	VARIABLES: INDEPENDIENTE Factores de crecimiento: EGF e IGF-I. Indicadores: • Concentración 1: 10 ng/ml • Concentración 2: 50 ng/ml DEPENDIENTE: • Maduración de ovocitos. • Desarrollo embrionario. Indicadores: • Tasa de maduración en %. • Tasa de desarrollo embrionario en %.	Población: Alpacas faenadas en el Matadero Municipal de Huancavelica. Muestra: 414 ovarios de alpacas faenadas Unidad muestral: 2369 ovocitos de alpaca de calidad I, II y III. Diseño de muestreo: No probabilístico Diseño experimental: Diseño Completamente Aleatorizado, con 12 y 10 repeticiones para MIV y CIV, respectivamente. Análisis estadístico: Análisis de Varianza (ANOVA), prueba de Duncan, Kruskal-Wallis y Bonferroni.