

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**“INFLUENCIA DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO EN EL
DESARROLLO DE EMBRIONES PROCEDENTES DE LA
FERTILIZACIÓN Y MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS DE
ALPACAS”**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. MADELEYNE ELSA CATARI QUISPE

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“INFLUENCIA DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO EN EL
DESARROLLO DE EMBRIONES PROCEDENTES DE LA
FERTILIZACIÓN Y MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS DE
ALPACAS”

TESIS PRESENTADA POR:

Bach. MADELEYNE ELSA CATARI QUISPE

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA



APROBADA POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE	:	 <hr/> Dr. Sc. NATALIO LUQUE MAMANI
PRIMER MIEMBRO	:	 <hr/> Mg. Sc. FAUSTINO QUISPE CONDORI
SEGUNDO MIEMBRO	:	 <hr/> MVZ. CIRIACO ZUMIGA ZUÑIGA
DIRECTOR	:	 <hr/> Dr. Sc. MANUEL GUIDO PEREZ DURAND
ASESOR	:	 <hr/> MVZ. DARWIN B. ARQUE MONZON

Área : Reproducción animal

Tema : Influencia de medios de cultivo en el desarrollo de embriones procedentes de la fertilización y maduración in vitro

Fecha de sustentación: 28 de diciembre de 2018

DEDICATORIA

“A Dios por haberme guiado y acompañado desde mucho antes de mi formación, en cada momento de mi vida.

A mis padres Elsa y Wilfredo por alimentarme con sueños y deseos de superación constante cada día.

A mis hermanos Susana y Angel , con quienes siempre puedo contar por ayuda desinteresada y sincera.

A Darwin B. por el apoyo incondicional que me brinda cada día y a nuestra hija Edrielle Liana que es el motor más grande que tengo para alcanzar mis metas”

AGRADECIMIENTO

A la universidad Nacional del Altiplano, y a la Facultad de Medicina veterinaria y zootecnia por haberme albergado en cada año de mi formación y darme la oportunidad de cumplir mis sueños.

A los docentes de la Facultad de Medicina veterinaria y zootecnia , por guiarme y enseñarme la senda para convertirme en médico.

Al Dr. Guido Perez quien es un gran maestro, amigo, y una excelente persona, con quien puedo contar cada vez que necesite ayuda.

Al Dr. Natalio Luque , Dr Faustino Quispe y Dr. Ciriaco Zuñiga miembros del jurado cuyas correcciones fue valiosa durante el proceso de elaboración de tesis.

A mis compañeros y amigos Noemi, Edita, Javier, Dante, Clever , de pregrado y de internado con quienes comparto sueños, metas, anécdotas, y muchas experiencias.

Al laboratorio de reproducción animal , donde pasé una parte importante de mi formación, cuyo personal asistencial y administrativo me enseñaron y ayudaron desinteresadamente.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	16
INDICE DE TABLAS	17
INDICE DE CUADROS	18
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS	19
RESUMEN.....	11
ABSTRACT	12
I. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. Objetivos de la investigación	14
1.1.1. Objetivo general.....	14
1.1.2. Objetivos específicos	14
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	15
2.1. Estado de la producción de embriones in vitro de camélidos.....	15
2.2. Importancia de la PIVE de camélidos en el mejoramiento genético	15
2.3. Proceso de la producción de embriones in vitro en camélidos	17
2.3.1. Colección de ovocitos	17
2.3.2. Maduración ovocitaria	18
2.3.3. Fertilización in vitro.....	20
2.3.4. Cultivo de embriones	23
2.3.5. Desarrollo embrionario	24
2.3.6. Medios para el cultivo de embriones	25
2.3.7. Evaluación de producción embriones	27
2.4. Antecedentes de trabajos de producción de embriones <i>in vitro</i> en camélidos	30
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	33

3.1. Lugar de estudio	33
3.2. Material de estudio	34
3.2.1. Material biológico	34
3.3. Metodología.....	34
3.3.1. Colección de ovarios y selección ovocitos.....	35
3.3.2. Cámara de incubación portátil de CO ₂	36
3.3.3. Preparación de medios	38
3.3.4. Maduración ovocitaria <i>in vitro</i>	42
3.3.2. Fertilización <i>in vitro</i>	43
3.3.4. Evaluación de fertilización y selección de cigotos	44
3.3.5. Cultivo embrionario.....	45
3.3.6. Evaluación de desarrollo embrionario	46
3.4. Método estadístico.....	47
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
4.1. Producción de embriones <i>in vitro</i> de alpacas en los medios de cultivo SOFaa, KSOMaa y TCM-199 en sus diferentes estados (mórula y blastocito) al séptimo día cultivo.....	48
4.2. Evaluación de la producción de embriones <i>in vitro</i> de alpacas según calidad embrionaria en diferentes medios de cultivo(SOFaa, KSOMaa y TCM).....	52
V. CONCLUSIONES	56
VI. RECOMENDACIONES	57
VII. REFERENCIAS.....	58
ANEXOS	64

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Colección de ovocitos en el camal de Ayaviri.....</i>	71
<i>Figura 2: Ovarios colectados en suero fisiológico +antibióticos a 35 °C.</i>	71
<i>Figura: 4 Selección de ovarios de alpaca</i>	71
<i>Figura: 3 Lavado de ovario con solución fisiología</i>	71
<i>Figura: 5 Ovario con folículo dominante</i>	72
<i>Figura: 6 Aspiración de COCs.....</i>	72
<i>Figura: 8 Preparación de medios de maduración</i>	72
<i>Figura: 7 Medio de maduración en placas de 2 pocillos</i>	72
<i>Figura: 9 Preparación de medio de fertilización.....</i>	72
<i>Figura: 10 Espermatozoides en swim up.....</i>	72
<i>Figura: 11 Preparación de medio de cultivo.</i>	73
<i>Figura: 12 Cámara de incubación portátil sumergida en baño maria</i>	73
<i>Figura: 13 Cámara de incubación portátil</i>	73
<i>Figura: 14 Cigotos cultivados 24 horas pos fertilización.</i>	73
<i>Figura: 15 Mórula.</i>	74
<i>Figura: 16 Mórula compacta.</i>	74
<i>Figura: 18 Blastocisto.</i>	74
<i>Figura: 17 Blastocisto inicial.</i>	74
<i>Figura: 19 Blastocisto expandido.....</i>	74
<i>Figura: 20 Blastocisto expandido.....</i>	74

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1: Producción de embriones in vitro de alpacas a los 7 días de cultivo por tratamiento.</i>	<i>48</i>
<i>Tabla 2: Clasificación según calidad de embriones producidos in vitro al séptimo día cultivados en diferentes medios.</i>	<i>53</i>
<i>Tabla 3: Resultados de desarrollo embrionario en medio KSOM.</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 4: Resultados de desarrollo embrionario en medio SOFaa.</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 5: Resultados de desarrollo embrionario en medio (TCM-199). .</i>	<i>66</i>

INDICE DE CUADROS

<i>Cuadro 1: Clasificación de la calidad de embriones.</i>	<i>27</i>
<i>Cuadro 2: Clasificación del estado de desarrollo de los embriones.</i>	<i>29</i>
<i>Cuadro 3: Distribución de cigotos para el cultivo embrionario.</i>	<i>34</i>
<i>Cuadro 4: Componentes de medio TCM 199 – Medio de maduración..</i>	<i>38</i>
<i>Cuadro 5: Medio Stock tyrode lactato modificado FERT TALP.</i>	<i>38</i>
<i>Cuadro 6: Medio stock tyrode lactato modificado SPERM-TALP.</i>	<i>39</i>
<i>Cuadro 7: Composición del medio fluido oviductal sintético (SOFaa). ...</i>	<i>40</i>
<i>Cuadro 8: Componentes del medio de optimización simple de potasio (KSOMaa).....</i>	<i>41</i>
<i>Cuadro 9: Componentes del Medio de cultivo tisular TCM -199 (control).</i>	<i>42</i>
<i>Cuadro 10: Medios de cultivo para el cultivo del 1er al 3er día pos fertilización.....</i>	<i>45</i>
<i>Cuadro 11: Medios para el cultivo del 3er a 7mo día pos fertilización..</i>	<i>45</i>

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

FSH	Hormona folículo estimulante
LH	Hormona luteinizante
COCs	Complejo cúmulos ovocitos
TCM	Medio de cultivo tisular
SOFaa	Fluido oviductal sintético + aminoácidos
KSOMaa	Medio de optimización simple de potasio + aminoácidos
BSA	Sero albumina bovina
PBS	Solución buffer fosfatada
μL	Microlitro
mL	Mililitro
g	Gramo
g.	Gravedades
mM	Milimolar
mOsm	Miliosmol
UI	Unidad internacional
mm	Milímetro
cm	Centímetro
um	Micrómetro
PHE	Solución de Penicilamina, hipotaurina y epinefrina
RPM	Revoluciones por minuto
HEPES	Solución tampón
eCG	Gonadotropina corionica equina
hCG	Gonadotropina corionica humana
CO₂	Dióxido de carbono
°C	Grados centígrados
FIV	Fertilización in vitro
MIV	Maduración in vitro
SFB	Suero fetal bovino
PIVE	Producción de embriones <i>in vitro</i>
ICSI	Inyeccionintracitoplasmatica

RESUMEN

La técnica de producción de embriones por fertilización *in vitro* en camélidos es aún insipiente por ello es necesario estudiarlo, para poder utilizarlo como un instrumento de mejoramiento genético y conservación de estas especies. El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano - Puno, a una altitud de 3820 msnm. El objetivo fue evaluar el porcentaje producción de embriones y calidad embrionaria de cigotos cultivados en diferentes medios (SOFaa, KSOMaa y TCM-199). La incubación en todos los procesos, como maduración ovocitaria, fertilización y cultivo embrionario se realizó en una incubadora portátil de CO₂ sumergida en un baño maría que provee las condiciones de atmosfera con 5% CO₂, alta humedad y temperatura de 38.5 °C. La maduración se realizó con TCM-199 suplementado con 5% de SFB, 10UI de eCG, 5UI de hCG por 36h, para la fertilización se utilizó el medio SPERM TALP como medio de preparación de los espermatozoides del conducto deferente, donde se realizó el proceso de SWIM UP por 30 min, para la selección e inicio de la capacitación espermática. Los ovocitos y espermatozoides fueron co-incubados por 18h en medio FERT TALP suplementado con 2UI/mL de heparina y 40 uL/mL de solución PHE. El análisis estadístico se realizó utilizando el Software SPSS V.21, realizando la prueba de ji-cuadrado en una tabla de contingencia de 3x2 en el primer objetivo y 3x4 para el segundo objetivo. La evaluación de desarrollo embrionario se realizó al día 7 post fertilización, donde se obtuvo una tasa producción de embriones (mórulas y blastocistos) de 35.6%, 26.7%, 18.6% para SOFaa, KSOMaa y TCM 199 (P<0.05) respectivamente; para calidad embrionaria los resultados fueron 16.1%, 6.3% y 3.5% para SOFaa, KSOMaa y TCM 199 (P<0.05) de embriones de calidad excelente; destacándose en ambas evaluaciones el medio de cultivo SOFaa. Se concluye que los embriones de alpaca requieren un mayor contenido energético y las condiciones de pH, osmolaridad, deben ser muy estables en el medio de cultivo, en comparación a otras especies.

Palabras clave: Alpacas, biotecnología, *in vitro*, desarrollo embrionario

ABSTRACT

The technique of production of embryos by in vitro fertilization in camelids is still incipient, therefore it is necessary to study it, to be able to use it as an instrument of genetic improvement and conservation of these species. The present work was carried out in the Reproduction Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of the National University of Altiplano - Puno, at an altitude of 3820 meters above sea level. The objective was to evaluate the percentage of embryo production and embryo quality of zygotes grown in different media (SOFaa, KSOMaa and TCM-199). The incubation in all the processes, such as oocyte maturation, fertilization and embryo culture was carried out in a portable CO₂ incubator submerged in a water bath that provides the atmospheric conditions with 5% CO₂, high humidity and temperature of 38.5 °C. The maturation was performed with TCM-199 supplemented with 5% SFB, 10UI of eCG, 5UI of hCG for 36h, for the fertilization the SPERM TALP medium was used as a means of preparing the sperm of the vas deferens, where the process was performed of SWIM UP for 30 min, for the selection and start of sperm training. The oocytes and sperm were co-incubated for 18h in FERT TALP medium supplemented with 2UI / mL of heparin and 40 uL / mL of PHE solution. The statistical analysis was performed using SPSS Software V.21, performing the chi-square test in a contingency table of 3x2 in the first objective and 3x4 for the second objective. The evaluation of embryonic development was performed on day 7 post fertilization, where an embryo production rate (morulae and blastocysts) was obtained of 35.6%, 26.7%, 18.6% for SOFaa, KSOMaa and TCM 199 (P <0.05) respectively; for embryo quality the results were 16.1%, 6.3% and 3.5% for SOFaa, KSOMaa and TCM 199 (P <0.05) of embryos of excellent quality; highlighting in both evaluations SOFaa culture medium. It is concluded that alpaca embryos require a higher energy content and the pH conditions, osmolarity, must be very stable in the culture medium, in comparison to other species.

Key words: Alpacas, biotechnology, in vitro, embryonic development.

I. INTRODUCCIÓN

La utilización de la fecundación in vitro (FIV) en camélidos sudamericanos podría ser una alternativa para el mejoramiento genético de camélidos domésticos y para la preservación de las especies silvestres. Sin embargo existen pocos reportes de FIV en camélidos sudamericanos (Del Campo et al, 1994; Berland et al, 2011). Si bien la transferencia de embriones tradicional (embriones producidos in vivo) ha sido exitosa (Taylor, 2003; Huanca et al, 2006a), produciendo cientos de crías de alpacas y llamas. Con la transferencia de embriones producidos por FIV solo se han reportado gestaciones tempranas en alpacas y llamas (Mendoza et al, 2013; Trasorras et al, 2014), estos resultados nos indican que aún se necesitan mayores estudios que permitan estandarizar y optimizar protocolos de maduración in vitro (MIV) y FIV y así obtener mayores tasas de gestación y natalidad.

El desarrollo de las biotecnologías reproductivas en los camélidos sudamericanos, permitiría la propagación de los animales genéticamente superiores, especialmente los que poseen fibra fina y de colores naturales (Miragaya et al, 2006). Estudios realizados en producción de embriones in vitro con el objetivo de desarrollar protocolos en camélidos sudamericanos son pocos. En llamas (Del Campo et al, 1994; Conde et al, 2008), alpacas (Ratto et al, 2007; Arriaga et al, 2014; Huanca et al, 2014), reportan del 6 al 20% de producción de embriones en diferentes estadios.

Mientras que en la especie bovina la producción de embriones in vitro es a nivel comercial, en forma de embriones frescos o congelados, oscilando las

tasas de preñez entre 50 % y 40% respectivamente, favoreciendo una mayor eficiencia y el avance genético en esta especie (Sansinema et al, 2007).

1.1. Objetivos de la investigación

1.1.1. Objetivo general

Determinar el porcentaje de embriones producidos en los diferentes medios de cultivo SOFaa, KSOMaa y TCM 199

1.1.2. Objetivos específicos

- Determinar el porcentaje de embriones producidos en los medios de cultivo SOFaa, KSOMaa y TCM 199 en sus diferentes estados (mórula y blastocito) en 7 días de cultivo.
- Determinar el porcentaje de embriones según su calidad morfológica producidos en los medios de cultivo SOFaa, KSOMaa y TCM 199 (excelente, buena, regular, mala, degenerado) en 7 días de cultivo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Estado de la producción de embriones in vitro de camélidos

La producción de embriones in vitro en camélidos sudamericanos demanda una gran cantidad de ovocitos capaces de ser fecundados. Los métodos utilizados para la obtención de ovocitos pos mortem son: aspiración o disección de los folículos de ovarios provenientes de mataderos; aspiración de los folículos luego de la exposición quirúrgica del ovario por laparotomía o la aspiración folicular guiada por ultrasonografía vía transvaginal.(Berland et al., 2011) El uso de ovarios provenientes de mataderos tiene como ventaja disponer de una enorme cantidad de ovocitos, pero su principal desventaja es que requiere de la maduración *in vitro* (IVM). Además, trabajando con ovocitos provenientes de ovarios de mataderos, se desconoce si los folículos considerados dominantes se encuentran en la fase de crecimiento o regresión, lo cual puede afectar la calidad ovocitaria (Huanca et al., 2014). La obtención de ovocitos a partir de animales vivos ofrece la posibilidad de aumentar la progenie de hembras genéticamente superiores y disminuir el intervalo generacional. En estos animales se puede aplicar un tratamiento de súper estimulación ovárica previamente a la obtención de los ovocitos para inducir el crecimiento folicular múltiple y maximizar el aprovechamiento de esas hembras.

2.2. Importancia de la PIVE de camélidos en el mejoramiento genético

El mejoramiento genético en camélidos y especialmente en alpacas, se realiza en la actualidad mediante selección fenotípica, predominando las características de la fibra y conformación. De esta manera se ha venido llevando programas de selección con poco éxito, ya que en la actualidad la cantidad de animales de categoría súper es mínima, alcanzando porcentajes de apenas el 5

% En camélidos sudamericanos y en la alpaca el intervalo generacional es de 3 años, y la disposición del macho a la monta es reducida (Bustinzá, 2001), estos factores imposibilitan que los criadores de camélidos tengan un mayor número animales de buenas características, ya que el tiempo necesario para obtener con pedigree conocido y pureza racial mayor al 90 % es de 5 generaciones, problema que junto al inadecuado manejo reproductivo hace que no sea posible un progreso genético mayor. Por otro lado para predecir el progreso genético debido a la selección se toma los factores como la exactitud de selección, intensidad de selección y la variación genética de la población; y si medimos la dimensión del tiempo, se agregaría el intervalo de generaciones (Cardelino y Rovira, 1987) dentro de estos factores la producción de embriones in vitro puede incrementar la intensidad de selección y reducir el intervalo generacional ya esta técnica nos permite trabajar con número reducido de animales para optimizar tanto los gametos femeninos y masculinos, y obtener un mayor número de descendencia en un corto ciclo productivo.

Además de ello la producción de embriones in vitro nos permite:

- Se pueden usar ovocitos de hembras muy jóvenes, ya sea vía aspiración por laparotomía, laparoscopia o mediante la técnica no invasiva Ovum Pick Up (OPU).
- Se pueden rescatar ovocitos de hembras de alto valor genético que por alguna razón ya no pueden quedar preñadas (infecciones del útero, accidentes de la madre, abortos).
- En caso de muerte súbita o necesidad de sacrificio de una hembra de elevado valor genético, pueden rescatarse ovocitos al momento del sacrificio o en el camal.

- Permite una alta selección del macho, ya que de un eyaculado se puede fertilizar una gran cantidad de ovocitos, que serán transferidos como embriones a varias hembras receptoras.
- En caso de animales en peligro de extinción, es posible almacenar los ovocitos para ser fertilizados y usados cuando las condiciones sean favorables para la especie (Vilela, 2014).

2.3. Proceso de la producción de embriones in vitro en camélidos

2.3.1. Colección de ovocitos

La obtención de ovarios provenientes de alpacas y llamas hembras beneficiadas en el camal es una fuente importante para la recuperación de complejos ovocito-cúmulo (COCs), facilitando gran disponibilidad de ovocitos a bajo costo, los que podrían ser madurados, fertilizados y cultivados in vitro hasta estados avanzados del desarrollo embrionario (Del Campo et al, 1992; Del Campo et al, 1994; Ruiz et al, 2007)

Recolección de ovocitos por aspiración

Vasquez et al. (2015) reportaron que los ovocitos son aspirados de los folículos visibles (mayores a 2 mm de diámetro) de la superficie ovárica con ayuda de una aguja de 20G x 1 adosado a una jeringa de 5mL en donde se contiene 1mL de Tampon Fosfato Salino (PBS), el contenido de la aspiración es vertido a una placa petri (10 x 36mm) y mantenido a 35°C sobre una platina térmica por 5 min para la sedimentación de los ovocitos, ofrece una media de 4.5 ovocitos por ovario.

Recolección de ovocitos por corte

En la recolección de ovocitos mediante corte Vásquez et al.(2015) informaron que los ovarios son colocados a una placa petry de vidrio (14 x 93mm) que contiene 2mL de Tampón Fosfato Salino (PBS), el ovario se fija con una pinza hemostática curva y los cortes se realizan en forma longitudinal y transversal con un bisturí, realizando cortes a 2 mm de distancia aproximadamente, posteriormente se procede a retirar los trozos del ovario cortado con ayuda de una pinza realizando antes un previo lavado con PBS y mantenido a 35°C sobre la platina térmica, obteniendo un promedio de 10 ovocitos por ovario.

2.3.2. Maduración ovocitaria

La maduración del núcleo del ovocito es un proceso que le permite reducir la carga cromosómica de la especie a la mitad, convirtiéndose en una célula haploide. Al inicio de la maduración, el núcleo del ovocito primario se encuentra bloqueado en la profase de diploteno de la primera división meiótica, estadio de vesícula germinal (GV). En la madurez del folículo y en respuesta a la elevación pre-ovulatoria de la LH, el ovocito reinicia la división meiótica (Gordon, 2003). El núcleo del ovocito entra en diacinesis, y al final de la profase I se disgrega la envoltura nuclear y ocurre la ruptura de la vesícula germinal. Al mismo tiempo se produce una polimerización de los microtúbulos, desaparecen los nucléolos y los cromosomas se condensan y se orientan formando el huso acromático correspondiente a la metafase I. Posteriormente, se separan los cromosomas homólogos, se produce la extrusión del primer corpúsculo polar, y se origina el ovocito secundario con un solo par de cromosomas.

A diferencia de la profase I, que es muy larga, la profase II, prácticamente no existe y el ovocito secundario comienza la segunda división meiótica, entrando directamente a la metafase II, donde la meiosis se interrumpe nuevamente (segundo bloqueo) y el ovocito es expulsado del ovario durante la ovulación. La segunda división meiótica termina cuando el ovocito es penetrado por un espermatozoide y se produce la extrusión del segundo corpúsculo polar. La necesidad de un tiempo de maduración prolongado en los camélidos podría ser explicado por las características propias de la especie, toda vez que son especies de ovulación inducida, que requieren de estímulos externos como la cópula y que la ovulación *in vivo* ocurre a las 30 horas posteriores a la aplicación del estímulo (Huanca et al, 2001).

Estudios realizados en una especie similar, el dromedario, señalan que los ovocitos requieren un tiempo óptimo de maduración *in vitro* de 36 horas, siendo el rango de 32 a 44 horas para obtener porcentajes mayores a 75% de ovocitos madurados en estadios de Metafase II (Abdoon et al, 2001; Khatir et al, 2004).

Los ovocitos de los camélidos presentan características propias, con un citoplasma oscuro, atribuido a la presencia de gotas lipídicas (Ratto et al, 2005).

Los ovocitos madurados se clasifican atendiendo dos criterios de madurez que son el aspecto morfológico y grado de expansión de células del *cúmulus*. Esta clasificación subjetiva no siempre corresponde a la madurez nuclear. (Bonilla et al., 2009)

2.3.3. Fertilización in vitro

Durante la fertilización normal, la entrada de espermatozoides en el ovocito desencadena una serie de oscilaciones de calcio intracelular, que son responsables de la activación del ovocito; sin embargo, este proceso se omite en el procedimiento ICSI. En varias especies como el humano, el conejo, el hámster y los ratones, el propio procedimiento de inyección es aparentemente suficiente para activar el ovocito, lo que lleva a la descondensación del espermatozoides y la formación de un pronúcleo. Sin embargo, en otras especies, se ha utilizado un estímulo de activación exógeno con productos químicos como el etanol y la ionomicina, seguido de una exposición inmediata a 6-DMAP, para obtener un mejor desarrollo embrionario (Wani et al, 2018)

Comprende una serie de procesos cuyo punto final está representado por la fusión de los núcleos de ambos gametos y la formación del genoma del nuevo individuo. Para que se concrete dicho evento *in vitro* es necesario que tanto el ovocito madurado sea cultivado con espermatozoides que hayan alcanzado la capacidad fecundante. (Palma, 2001).

En el año 2008 en Perú se realizaron los primeros reportes de FIV en alpacas (Mendoza et al, 2008). Gamarra et al. (2008) utilizaron espermatozoides congelados de alpaca para fertilizar ovocitos madurados in vitro, obtuvieron 27,1% de división a las 72 horas. Mendoza et al. (2008) compararon los métodos de gradiente de Percoll y Swim up para la recuperación de espermatozoides epididimarios y utilizarlos en la FIV de

ovocitos de alpaca. Obtuvieron 36,0% y 43,9% de división, para Percoll y Swim up respectivamente.

Otra de las técnicas más actuales utilizadas en camélidos es la ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection). Esta técnica fue primeramente llevada a cabo por Miragaya et al. (2003) y los ovocitos obtenidos quirúrgicamente e inyectados con espermatozoides eyaculados alcanzaron un 36% de maduración (M II) y 16% de estadio de mórula.

Colección de espermatozoides

La preparación del semen que se utiliza en PIV de embriones, requiere de la aplicación de técnicas con las cuales se recupere un alto porcentaje de espermatozoides móviles con morfología normal, libre de detritus y espermatozoides muertos. Para obtener embriones se han utilizado espermatozoides de epidídimo o de eyaculado. El uso de espermatozoides del epidídimo tiene la ventaja de que estas células tienen movilidad progresiva y que el manejo de la muestra es más fácil porque no tiene plasma seminal. La principal desventaja es que no se utiliza espermatozoides de machos genéticamente superiores (Giuliano y Trasorras, 2011).

Giuliano y Trasorras. (2011) para el FIV e ICSI utilizaron eyaculados incubados en una solución de 1 mg/ml de colagenasa en medio H TALP BSA ya que la mayoría de los espermatozoides no se presentan movilidad progresiva y el manejo de las muestras es difícil debido a la viscosidad y a la filancia del plasma seminal.

Para poder utilizar las técnicas de ICSI y FIV con semen de machos de alto valor genético, es necesario utilizar un buen método de recolección de semen y aplicar protocolos que permitan la separación y selección de espermatozoides móviles de del plasma seminal.

El método de filtración “Glass- wool” es otra alternativa para la purificación espermática, que tiene la ventaja que provee semen con una viabilidad cercana al 100%. Los lavados por sedimentación y resuspensión a través de la centrifuga ayudan a separar los materiales indeseables de una forma rápida y efectiva, además aumentan la motilidad espermática. (Huanca et al, 2007)

Evaluación de fertilización

Del campo et al. (1994) realiza a la post fertilización, denudación de los ovocitos mediante agitación con vórtex durante 4 series y 3 mim, respectivamente, y se lavaron 3 veces. Para la evaluación se utilizó TALP-HEPES. Aproximadamente el 46% de los ovocitos se examinaron microscópicamente para detectar signos de fertilización. Se consideró que un ovocito estaba fertilizado (fertilización total) cuando 1 o más espermatozoides o cabezas de espermatozoides descondensadoras o 2 o más pronúcleos con 1 o más colas de esperma estaban presentes en el ovoplasma. La frecuencia de la fertilización normal se determinó como una proporción de ovocitos con 2 pronúcleos y 1 cola de esperma con respecto al número total de ovocitos fertilizados.

2.3.4. Cultivo de embriones

Durante el cultivo embrionario *in vitro* ocurren cuatro eventos importantes en lo que se refiere al desarrollo desde la etapa de cigoto hasta la formación del blastocisto: la primera división embrionaria, cuyo momento de presentación es crítico para el subsecuente desarrollo del embrión, la activación del genoma embrionario en la etapa de ocho a dieciséis células, la compactación de la mórula en el día cinco y la formación del blastocisto al día seis ó siete. Por lo tanto, las condiciones inadecuadas del ambiente de cultivo que pudieran afectar alguno o todos estos eventos podrían tener un efecto deletéreo sobre: la calidad del embrión (Ahuja et al, 2009).

Actualmente la producción de embriones *in vitro* se interesa en 2 aspectos básicos con son el desarrollo de medios de cultivo que respondan a las necesidades metabólicas de los embriones durante su desarrollo y la segunda que eviten en su composición células somáticas. (Novoa y Leyva, 1996).

Para lograr esto es necesario conocer los requerimientos bioquímicos de los embriones durante su desarrollo hasta el estadio de blastocistos tanto *in vivo* como *in vitro*. Se han estudiado las características bioquímicas del medio, las cuales variaron con el tiempo de cultivo, indicando la existencia de una compleja interacción entre el metabolismo embrionario y los sustratos del medio (Palma, 2001).

Las técnicas que se utilizan para el cultivo embrionario *in vitro* pueden ser: co-cultivo de diferentes tipos de células o la utilización de medios de cultivos sintéticos definidos o semi-definidos. Utilizando el medio de cultivo SOF con el agregado de SFB y realizando la renovación del medio de cultivo cada 48 horas, nuestro grupo de trabajo obtuvo la primera preñez en la llama a partir de un embrión producido *in vitro* (Trasorras et al, 2014).

Se han utilizado varias técnicas para el cultivo de embriones *in vitro* en una variedad de especies, incluidos los cocultivos de células epiteliales de oviducto (Del Campo et al, 1994), sobrenadantes de cultivo celular de oviducto (Mermillod et al, 1992), células de la granulosa (Khatir et al, 2004), medio de fluido de oviducto sintético (SOF) sin suplementación celular (Tervit et al, 1972), Charles'sRosnkran's (CR) 1 (Rosenkras et al, 1993) medio CR2 (Tavares et al, 2002), y medio optimizado de potasio simple (KSOM) (Nedambale et al, 2002).

2.3.5. Desarrollo embrionario

La segmentación o división embrionaria, es un proceso después de la fecundación, los cigotos experimentan varias divisiones mitóticas. Esta secuencia de duplicaciones continúa durante el resto del periodo de segmentación temprana, las segmentaciones iniciales suelen ocurrir simultáneamente en todos los blastómeros, pero la sincronización se pierde inevitablemente y los blastómeros comienzan a dividirse de manera independiente unos de otros. Una vez que el embrión ha formado 16 blastómeros, se denomina mórula (Hafez, 2002)

Calidad Embrionaria

La calidad embrionaria es uno de los factores que afecta directamente al resultado de la transferencia, tomando los criterios más usados como son las morfológicas que incluyen configuración, color, número y densidad de las células, tamaño del espacio perivitelino, etc, y está relacionada con la viabilidad después de congelación, demostrando que la calidad del embrión es un predictor más exacto del éxito (Linder y Wrigth, 1983). Palma y Brem. (1993) ratifica que los embriones clasificados como excelentes o buenos tiene una alta probabilidad de alcanzar la preñez (60-70 por ciento), mientras los de muy baja calidad no concluyeron en preñeces.

2.3.6. Medios para el cultivo de embriones

En numerosos laboratorios los medios de cultivo suelen ser comprados al fabricante y solo en algunos casos fabricados en el propio laboratorio, dependiendo generalmente de la complejidad del medio en sí mismo. Los medios auto fabricados suelen tener un coste superior ya que se requieren medidas de asepsia estrictas y la mejor calidad posible de agua y de componentes, que a su vez han de haber sido testados para evitar una posible toxicidad sobre los embriones. Después de pesar todos los componentes del medio, la preparación final debe ser realizada bajo una mesa de flujo laminar y las soluciones finales almacenadas en recipientes estériles, bien de plástico o de cristal. Normalmente los medios complejos. Otros componentes del medio, como son los factores de crecimiento y el suero deberán haber sido alicuotados y congelados a -70°C , ya que esta temperatura previene el deterioro y la desnaturalización

de las proteínas, que producen su indisolubilidad al precipitar los componentes del medio. La repetición de sucesivas congelaciones no afecta a la eficacia del suero para su utilización normal en los medios de cultivo ni en las transferencias de los embriones (Palasz et al, 1995).

El medio más usado y exitosamente empleado en la maduración de ovocitos es el Tissue Culture Medium 199 (TCM 199), compuesto por sales Earle's con 4-(2-Hidroxietil)- 1-piperazinaetansulfónico (HEPES) y bicarbonato como estabilizadores de pH y suplementado con piruvato, lactato, vitaminas, aminoácidos, purinas, proteínas (albumina bovina o suero). Los ovocitos como los embriones y la mayoría de las líneas celulares se desarrollan a un pH de 7,4 (Hafez, 2002).

El KSOM es un medio semi-definido desarrollado inicialmente para embriones de ratón (Lawitts y Biggers, 1991). Este sistema se adaptó a otras especies, incluidos los bovinos (Liu y Foote, 1995; Nedambale et al, 2002; Tavares et al, 2002), mediante la adición de aminoácidos esenciales y no esenciales con o sin una fuente de proteínas como el alcohol polivinílico (PVA) (Liu y Foote, 1995), albúmina de suero bovino (BSA) (Liu y Foote, 1995) o suero de ternera fetal (FCS) (Lee et al, 1999).

El co-cultivo con células somáticas es una técnica satisfactoria para producir embriones (Krisher et al, 1999). Sin embargo, estas condiciones no definidas hacen que sea difícil o imposible examinar los requisitos nutricionales de los embriones y contribuyen a la variabilidad en la composición del sistema de cultivo (Bavister, 1995). Además del riesgo de contaminación utilizando sistemas de co-cultivo, la presencia de células en el cultivo puede modificar los sustratos disponibles y usados por el embrión,

alterando las concentraciones conocidas en el medio de cultivo original (Edwards et al, 1997). Además, las células presentes en el medio de cultivo pueden competir con los embriones por los nutrientes o tener efectos perjudiciales en el desarrollo del embrión debido a su desecho metabólico.

2.3.7. Evaluación de producción embriones

La evaluación precisa del embrión es uno de los pasos más importantes para que la transferencia de embriones producidos *in vitro* sea exitosa en las receptoras. Aunque existen muchos métodos alternativos para determinar la viabilidad embrionaria, la evaluación basada en criterios morfológicos continúan siendo la más simple, rápida y confiable. La evaluación morfológica realizada con el estereoscopio es la más utilizada y generalmente se realiza después de la búsqueda y localización de los mismos (Palma, 2001)

Algunas de las características que se analizan para calificar a los embriones se describen a continuación: forma del embrión, color, textura de la masa celular, número y compactación de las blastómeras, diferenciación del tamaño entre blastómeras, tamaño del espacio perivitelino, presencia de blastómeras sueltas, degeneradas o detritus celulares, presencia y tamaño de vesículas (indican degeneración) y apariencia de la zona pelúcida (Galina y Valencia, 2011)

Los embriones son evaluados por varios criterios, habiéndose adoptado el de International Embryo Transfer Society (IETS), que fue desarrollado por Linder y Wrigth (1983). Se describe en el cuadro 1, donde se detalla las características para clasificar los embriones:

Cuadro 1: Clasificación de la calidad de embriones.

Calidad	Características
1 Excelente	Masa embrionaria esférica y simétrica, con células (blastómeros) uniformes en cuanto a tamaño, color y densidad. Al menos el 85% del material celular debería ser una masa embrionaria intacta y viable. La zona pelúcida deberá presentar superficies lisas.
2 Bueno	Bueno Irregularidades moderadas en cuanto al aspecto, forma, tamaño, color y densidad de las células. Al menos el 50% del material celular deberá encontrarse intacto y correspondería con una masa embrionaria viable
3 Regular	Irregularidades mayores en la forma y tamaño de la masa embrionaria, así como en el tamaño, color y densidad de células individuales. Al menos el 25% del material celular deberá encontrarse intacto y correspondería con una masa embrionaria viable.
4 Malo	Ovocito de 1 célula, degenerado, no viable

Fuente: International Embryo Transfer Society (IETS) Linder y Wrigth (1983)

Respecto a la clasificación de embriones obtenidos mediante el cultivo in vitro, Palma. (2001) mencionan que el estado de desarrollo del embrión se identifica de acuerdo con el desarrollo morfológico, por ello los

primeros estadíos se denominan según el número de células: 2 células, 4 células, 8 células, hasta 16 células y luego reciben diferentes nombres como mórula, blastocisto según su estado de desarrollo. Adicional a estas denominaciones Bó y Mapletoft. (2013) señalan códigos de clasificación estándar basados en el Manual IETS, los siguientes estadíos se describen a continuación (cuadro 2):

Cuadro 2: Clasificación del estado de desarrollo de los embriones.

ESTADÍO	CARACTERÍSTICAS
Mórula	Dificultad para discernir uno de los blastómeros, la masa celular (embrión) ocupa la mayor parte del espacio perivitelino (edad estimada 5 días)
Mórula compacta	En la cual sus blastómeros están unidos y constituyen una sola masa compacta que ocupa entre el 60-70% del espacio perivitelino.
Blastocisto temprano	Estadío en el cual se forma una cavidad (blastocelo) en el interior del embrión. El MCI (masa celular interna) ocupa un 70-80% del espacio perivitelino (edad estimada 7 días).
Blastocisto	Existe una marcada diferenciación entre el trofoblasto externo y el macizo celular interno, el blastocelo ocupa el 50% del

	espacio perivitelino (edad estimada 7 -8 días).
Blastocisto expandido	El diámetro aumenta considerablemente con el consecuente adelgazamiento de la zona pelúcida a 1/3 de su espesor, origina la presión creciente del blastocisto en crecimiento (edad estimada 7-8 días).
Blastocisto eclosionado	Los embriones están en proceso o han abandonado la zona pelúcida. Su forma puede ser esférica con un blastocele bien definido o colapsado.

Fuente: International Embryo Transfer Society (IETS)

2.4. Antecedentes de trabajos de producción de embriones *in vitro* en camélidos

En el estudio de Trasorras et al. (2014) evaluaron la competencia de desarrollo y la tasa de preñez de los blastocistos eclosionados por llama producidos *in vitro* utilizando gametos de animales vivos y dos condiciones de cultivo diferentes. En la maduración ovocitaria utilizaron ovocitos aspirados por laparotomía y para la fertilización utilizaron espermatozoides mediante electroeyaculación. Después de 24 h, post fertilización colocaron en medio SOFaa suplementado con FCS y se asignaron al azar a una de las dos condiciones de cultivo. La condición de cultivo 1 (CC1) consistió en 6 días de cultivo (n = 28) y la condición de cultivo 2 (CC2) consistió en renovar el medio de cultivo cada 48 h (n = 35). En CC1, la tasa de blastocistos fue de 36% (10/28) y la tasa de blastocistos eclosionados fue de 28% (8/28) mientras que en CC2,

la tasa de blastocistos fue de 34% (12/35) y la tasa de blastocistos eclosionados fue de 20% (7 / 35) ($p > 0.05$). No se obtuvieron embarazos después de la transferencia de embriones (ET) de blastocistos CC1 (0/8), mientras que se obtuvo un embarazo (1/7) después de transferir un blastocisto eclosionado de CC2. Cuatro y dos días después de la ET, se perdió la preñez.

El trabajo de Perez et al. (2017) evaluó el efecto del cultivo *in vitro* e *in vivo* de los cigotos de alpacas producidos *in vitro*. En la maduración se utilizó Complejos cumulus ovocitos (CCOs), obtenidos de los ovarios procedentes de alpacas beneficiadas en el camal estos fueron madurados TCM 2520 y cultivados a 38.5°C, bajo 5% de CO₂, y alta humedad por 36 h. La fertilización se realizó en FERT TALP. Para el cultivo *in vitro* se utilizó el SOFaa. Para el cultivo *in vivo* se utilizó el oviducto de hembras. Los resultados fueron evaluados: A las 120 h de cultivo *in vitro* post inseminación se observaron 19(17.4%) mórulas y 8 (7.3%) blastocitos y a las 168 h se observaron 18 (16.5%) mórulas y 7(6.4%) blastocitos. Del cultivo *in vivo* en el oviducto de las alpacas receptoras se recuperaron 3 blastocitos eclosionados, 5 blástulas y 2 blástulas colapsadas.

Un estudio en dromedarios por khatir et al. (2005) evaluaron la competencia de desarrollo y la tasa de embarazo de embriones *in vitro* (IVP) se estudiaron en dos sistemas de cultivo: un medio modificado semi-definido (mKSOMaa) y otro con co-cultivo utilizando células oviductales epiteliales de camello. Se complejos de cúmulos y ovocitos (AOC), se dejaron madurar, se fertilizaron y se cultivaron *in vitro* en medio TCM 199 (38.5 ° C; 5% de CO₂, humedad máxima > 95%, con una concentración de oxígeno del 5% para medio semi-definido y 20% para células de co-cultivo) durante 30 h. La fertilización *in vitro* (FIV) se realizó con semen fresco en medio FERTALP. Las COC fertilizadas

se denudaron mediante agitación con vórtex, luego se cultivaron en mKSOMaa (se añadió FCS al 10% con tratamiento térmico 24 h después de la FIV), bajo 5% de O₂ y 90% de N₂ (grupo 1; n = 249) o con monocapas de células oviductales epiteliales dromedarias en TCM-199 con 10% de FCS tratado térmicamente bajo 20% de O₂ (grupo 2; n= 254). La tasa de escisión fue significativamente mayor ($p < 0.05$) para el grupo 1 (63%, 156/249) que para el grupo 2 (51%, 130/254). No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos en la tasa de desarrollo de blastocistos (21% frente a 16,5%) y su incubabilidad (21% frente a 14%). Las tasas de preñez fueron similares durante los primeros 60 días. Sin embargo, todos las preñeces se perdieron después de 60 días, con la excepción de dos de seis (33%) de los receptores de blastocistos eclosionados del grupo 1. Los embriones obtenidos por cultivo en el medio semi-definido (mKSOMaa) parecen tener una mejor capacidad de desarrollo in vivo.

Nedambale et al. (2004) realizaron un estudio para identificar un sistema mejorado in vitro de cultivo de embriones libres de células; los presuntos cigotos se asignaron aleatoriamente a cuatro tratamientos medianos sin co-cultivo: (1) SOF + 5% FCS durante 9 días; (2) KSOM + 0: 1% de BSA durante 4 días y después KSOM + 1% de BSA hasta el día 9; (3) SOF + 5% de FCS durante 4 días y después KSOM + 1% de BSA hasta el día 9; (4) KSOM + 0: 1% de BSA durante 4 días y después SOF + 5% de FCS al día 9. El tratamiento 4 (sistema secuencial KSOM-SOF) mejoró ($P > 0:05$) mórulas (47%), Blastocistos (26%), blastocistos del día 7 (36%), número de células, así como tasa de eclosión total (79%) en comparación con KSOM sola (Tratamiento 2). Los embriones cultivados en KSOM + BSA solo se desarrollaron lentamente y la mayoría de ellos nacieron tarde en el día 9, en comparación con otros tratamientos. En

conclusión, la sustitución de KSOM con SOF después de 4 días de cultivo produjo blastocistos de mejor calidad.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

El trabajo investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, que se encuentra en la ciudad universitaria de la Universidad Nacional del Altiplano - Puno, a una altitud de 3824 m con 15°49'20.4"latitudSur y 70°01'07.3"longitudOeste, durante los meses de enero a junio de 2017 con una variación de temperatura de -2 a 20 °C y una humedad relativa que osciló entre 36 a 55%. (SENAMHI, 2017).

3.2. Material de estudio

3.2.1. Material biológico

- a) Ovocitos: Se utilizaron 686 ovocitos obtenidos por aspiración de ovarios de alpacas recolectados post mortem.
- b) Cigotos: Una vez fertilizados los ovocitos, estos fueron separados y seleccionados para el cultivo in vitro.

Cuadro 3: Distribución de cigotos para el cultivo embrionario.

T1 SOFaa	T2 KSOMaa	T3 TCM-199
87	86	86

T1= Medio de cultivo SOFaa T2=FFg = Medio de cultivo KSOMaaT3= TCM-199

- c) Espermatozoides del conducto deferente: Se colectaron espermatozoides de 2 alpacas Huacaya adultos con desviación del conducto deferente.

3.3. Metodología

3.3.1. Colección de ovarios y selección ovocitos

a. Transporte de ovarios

Los ovarios de alpacas (adultas y no gestantes), fueron colectados de centros de beneficio de la ciudad de Ayaviri- Melgar – Puno.

Los ovarios fueron transportados hacia el laboratorio de Reproducción Animal de la FMVZ, dentro de bolsas de polietileno que contenían solución salina (0.9% NaCl) + antibióticos (100 U.I. /mL de penicilina + 1 mg/mL de estreptomicina), en un termo con agua caliente de 30 a 35°C, la duración del transporte no excedió las 4 horas, según recomienda (Arriaga et al, 2014).

b. Colección de ovocitos

La técnica utilizada para la obtención de ovocitos del ovario fue la aspiración para lo cual, los ovarios fueron lavados 2 veces con suero fisiológico temperado a 35°C y secados con papel toalla.

La aspiración se realizó fijando el ovario a nivel del hilo con una pinza hemostática kelly y se procedió a la aspiración del líquido folicular y COCs, de folículos con una medida de 2 a 5 mm mediante el uso de una aguja 20 G X 1 adosado a una jeringa de tuberculina (1mL) y con una presión de 12 mL/ min (velocidad del embolo de la jeringa).

Los CCOs y fluido obtenido fueron vertidos a un tubo de ensayo de 10 mL de capacidad dentro de un baño María a 38°C, dejando sedimentar por 20 minutos.

El sedimento se vertió en placas Petri (35 x 10mm), y se procedió a enjuagar el tubo con TCM + 10% Suero Fetal Bovino (SFB), y se dejó en reposo 2 a 3 min, para luego realizar la búsqueda con ayuda de un microscopio estereoscopio a un aumento de 25 X.

c. Clasificación de los ovocitos

Una vez separados los ovocitos de los restos iniciales de la aspiración folicular (detritus, células de cumulus y fluido folicular), estos fueron lavados 2 veces en medio TCM+ 10 % de SFB.

Los ovocitos se clasificaron teniendo en cuenta el número de capas de células del cumulus y la apariencia del citoplasma, utilizándose la siguiente categorización: Categoría A = Presentan más de tres capas compactas de células del cúmulo que los rodean en toda su superficie; Categoría B= presentan tres capas compactas de células del cúmulo. (Gordon, 2003)

Solo los ovocitos de las categorías A y B fueron seleccionadas para la maduración *in vitro*.

3.3.2. Cámara de incubación portátil de CO₂

La cámara de incubación crea el ambiente necesario que simula el entorno del oviducto materno, por lo cual se utiliza cámaras

de incubación que cumplen las condiciones de 5% de CO₂, alta humedad y temperatura de 38.5 °C, estas condiciones deben estar presentes en todos los procesos de producción de embriones *in vitro* (maduración, fertilización y cultivo).

El laboratorio de reproducción animal no cuenta con una incubadora convencional apta para la producción de embriones *in vitro* sin embargo se ideó un método similar, que es planteado por Suzuki et al. (1999) y que se adecuó una cámara portátil de incubación de la siguiente manera:

La cámara de incubación portátil es una caja de plástico con las siguientes medidas (largo= 16cm, ancho=11cm, alto= 5.8 cm), y con un volumen de 500 cm³ (Figura 13).

Para modular las características de gasificación, se acondicionó en la tapa una válvula de conexión para evitar la salida del contenido gaseoso.

Para la adición de CO₂ dentro de la cámara portátil se colocó un recipiente cilíndrico (diámetro= 35 mm y alto= 20 mm), dentro de este a la vez se colocó 0.21 g de gránulos efervescentes de bicarbonato de sodio y sulfato de magnesio (Sal de Andrews®)

Una vez cerrada herméticamente la cámara se procede a extraer con una jeringa la cantidad de 50 mL de aire, siempre controlando con la válvula. Por último a través de la válvula se adiciona 5 mL de agua destilada-desionizada sobre los gránulos efervescentes para la liberación de CO₂ en el interior de la cámara.

La cámara de incubación portátil es sumergida en un baño maría temperada a 38.5 °C. (Figura 11). Todos los procedimientos de incubación (maduración, fertilización y cultivo) se realizaron utilizando esta cámara así como la adición de CO₂.

3.3.3. Preparación de medios

Medio de maduración: TCM-199 – Medio de maduración

Para el medio de maduración se preparó el medio TCM-199 0.25-mM Hepes (STOCK), la cual se mantuvo en congelación en crioviales de 1mL a -40 °C.

Cuadro 4: Componentes de medio TCM 199 – Medio de maduración.

Componente	g/10 mL
TCM-199 (c/sales de Earl, 0.25 Mm Hepes)	0.151 g
Piruvato de sodio	0.022 g
NaHCO ₃	0.022 g
Gentamicina	50 ug/mL
eCG	20 U.I/mL
hCG	100 U.I/mL

Se filtró en micro poro de 0.22 μ y se ajustó el pH de 7.2 a 7.4.

Medio para la fertilización in vitro

El medio FERT TALP (Parrish et al, 1988) es el medio utilizado para el co-cultivo de los ovocitos y espermatozoides, para lo cual se preparó y se conservó a 5°C en viales de 5 mL.

Cuadro 5: Medio Stock tyrode lactato modificado FERT TALP.

COMPUESTO	Final Mm	50 mL	100mL
NaCl	114	333 mg	666 mg
KCl	3.2	11.75 mg	23.5 mg
NaHCO ₃	25.0	105.2 mg	210.4 mg

NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.4	2.76 mg	5.52 mg
Gentamicina	24mg/mL	16.5 uL	33 uL
Rojo fenol	1%	50 uL	100 uL

Homogenizar suavemente y agregar los siguientes componentes

CaCl ₂ 2H ₂ O	2.0	15 mg	30 mg
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.5	5 mg	10 mg

Determinar el pH y ajustar a 7.4 y la osmolaridad a 290-300 mOsm

Posteriormente la solución se filtró con un dispositivo de microporo 0.22 um, y se conservó.

FERT-TALP solución de trabajo

El día de su uso se preparó:

		Cantidad /mL
Sperm-Talp (stock)	1mL	5 mL
BSA Fracción V	6 mg/mL	30 mg
Piruvato de sodio (stock)	10 uL/mL	50 uL
Gentamicina	25 ug/mL	125 ug

Se Homogenizo y se ajusto el pH a 7.5 con la adición de CO₂.

Medio de preparación y selección de espermatozoides.

Se utilizó el Medio SPERM TALP (Parrish et al,1988), el cual se conservó a 5°C en viales de 5 mL.

Cuadro 6: Medio stock tyrode lactato modificado SPERM-TALP.

Compuesto	Final mM	50 mL	/100 mL
NaCl	100	292.0 mg	584 mg
KCl	3.1	11.5 mg	23 mg
NaHCO ₃	25.0	105.0 mg	210 mg
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.3	2.0 mg	4 mg
Hepes	10.0	119.0 mg	238 mg
Gentamicina	25 ug/mL	50 uL	100 uL
Lactato de sodio (60%)	21.6 uL	184 uL	368 uL

Rojo fenol (1%)	1 uL/mL	50 uL	100 uL
-----------------	---------	-------	--------

Agregar estos dos componentes al final, agitando suavemente la solución

CaCl ₂ .2H ₂ O	2.0	15.5 mg	31 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.4	4.0 mg	8 mg

Se ajustó el pH a 7.4 y por último se filtró con un micro poro 0.22 um

Sperm-Talp solución de trabajo

El día de su uso se preparo

Cantidad /mL		
Sperm-Talp (stock)	1mL	5 mL
BSA Fracción V	6 mg/mL	30 mg
Piruvato de sodio (stock)	10 uL/mL	50 uL
Gentamicina	25 ug/mL	125 uL

Se ajustó el pH a 7.4 con la adicción de CO₂.

MEDIOS DE CULTIVO

Lo medio de cultivo se prepararon y conservaron por espacio de 3 meses como máximo.

Medio de cultivo SOFaa según Tervit et al (1972), modificado por Fisher y Brown (2005)

Cuadro 7: Composición del medio fluido oviductal sintético (SOFaa).

Componentes	mM	g/ 100 mL
CaCl ₂ 2H ₂ O	1.7	0.0251
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.49	0.0100
NaCl	99.25	0.5800
KCl	7.16	0.0534
NaHCO ₃	26.19	0.2200
KH ₂ PO ₄	1.14	0.0162
Piruvato de sodio	0.33	0.0036
HEPES	19.97	0.4760
Gentamicina		40 uL
Lactato de sodio60%		47 uL
D- Glucosa	1.5	0.0270
BSA (serumalbuminbovine)	4g/L	0.4000
Glicina	10	0.0750
Alanylglutamina	0.67	0.0146

MEN aminoácidos no esenciales	1%	1 mL
MEN aminoácidos esenciales	2%	2 mL
Rojo Fenol 1%	1%	100 uL
PVA (alcohol polivinílico)	11.62	0.1000
Agua ultra pura		100 mL

Se homogenizo suavemente y se ajustó el pH a 7.4 con NaOH, la osmolaridad debe estar en 280 mOsm

Se filtró en microporo de 0.22 um

Por último se conservó en crioviales de 1 mL de capacidad a -40 °C.

Medio de optimización simple de potasio (KSOMaa) modificado por Fisher y Brown (2005).

Cuadro 8: Componentes del medio de optimización simple de potasio (KSOMaa).

Componentes	mM	g/ 100 mL
NaCl	95	0.5552
KCl	2.5	0.0186
KH ₂ PO ₄	0.35	0.0048
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.025	0.0250
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.20	0.0049
NaHCO ₃	25	0.2100
Piruvato de sodio	0.20	0.0022
BSA (serum albumin bovine)	4g/L	0.4000
Lactato de sodio 60%	10	0.1121
EDTA	0.01	0.0004
D- Glucosa	0.2	0.0036
Gentamicina		40 uL
MEN aminoácidos no esenciales	1%	1 mL
MEN aminoácidos esenciales	2%	2 mL
Rojo fenol 1%	1%	100 uL
Agua ultra pura		100mL

Se homogenizo suavemente y se ajustó el pH a 7.4 con NaOH, la osmolaridad debe estar en 280 mOsm.

Se filtro en microporo de 0.22 um

Se conservó en viales de 1 mL de capacidad a -40 °C.

Medio de cultivo tisular TCM -199

Cuadro 9: Componentes del Medio de cultivo tisular TCM -199 (control).

Componente	g/100 ml
TCM-199 (c/sales de Earl, 0.25 Mm Hepes)	1.51 g
Piruvato de sodio	0.22 g
NaHCO ₃	0.22 g
Gentamicina	50 ug/mL

Se homogenizo suavemente y se ajusto el pH a 7.4 con NaOH, la osmolaridad debe estar en 280 mOsm

Se filtró en microporo de 0.22 um

Se conservó en viales de 1 mL de capacidad a -40 °C.

3.3.4. Maduración ovocitaria *in vitro*

Se realizó de acuerdo al protocolo de Huanca et al (2014), con ligeras variaciones y adecuaciones.

El medio de maduración fue preparado de la siguiente manera:

TCM-199+ 5%SFB+ 10UI eCG+ 5 UI hCG+ 10 uL de antibiótico (gentamicina+ anfoterisina)

El medio de maduración se colocó en una placa petry en una cantidad de 500 uL y se cubrió con aceite mineral, este medio se estabilizo dentro de la cámara portátil de CO₂ 2 h antes de iniciar la maduración de ovocitos.

Los ovocitos seleccionados fueron transferidos al medio de maduración en número máximo de 25 por gota de 500 uL.

Una vez colocada la placa Petri (medio de maduración y ovocitos) se aseguró la cámara portátil y se adiciono 5 % de CO₂ mediante el procedimiento descrito anteriormente, para ser sumergidos en baño maría convencional a 38.5°C por 36 horas para su correspondiente maduración.

3.3.2. Fertilización in vitro

a. Colección de espermatozoides.

Se utilizaron espermatozoides de dos machos con desviación de los conductos deferentes (Pérez et al, 2006). La colección de los espermatozoides se colocó a los machos en posición decúbito lateral, sujetos con ayuda de personal auxiliar.

La solución para colectar fue 1 mL de solución de tiroides modificado SPERM TALP; (Parrish et al, 1988).

b. Selección de espermatozoides:

El medio de colección fue 1 mL de solución de tiroides modificado SPERM TALP; Parrish et al. (1988), es una solución química que preparara los espermatozoides para el inicio de la capacitación, ya que los espermatozoides pasan por swim up (selección de espermatozoides vivos que sobre nadan en la superficie del medio), para que se de esta situación este medio se llevó a baño maría por 1/2 h a 38.5°C, con 5% de CO₂ y alta humedad (tubo sellado más la adición 5% de CO₂). (Figura 10).

c. Fertilización *in vitro*.

Para realizar la fertilización se prepararon gotas de 0.5 mL de solución de tiroides modificado (FERT TALP; Parrish et al., 1988), en placas Petri de 4 pocillos que se cubrieron con aceite mineral y se colocaron dentro de la cámara portátil, y está a la vez dentro de baño maría para su equilibración por 2 horas antes de la fertilización propiamente dicha.

Los ovocitos maduros se lavaron tres veces en gotas de FERT TALP anteriormente equilibrados, para ser finalmente colocadas al medio de fertilización de 0.5 mL, a este último medio se adiciono 1 UI de heparina sódica y 20 uL de la solución penicilamina, epinefrina e hipotaurina (PHE).

Por último, se co-incubaron en medio FERT TALP los ovocitos + 5 μ L de espermatozoides seleccionados en una concentración ajustada de 2.5×10^6 de espermatozoides por gota de 500 uL (Conde *et al.*, 2008), tomando en cuenta la motilidad total >50%.

La placa petri que contiene los ovocitos maduros + espermatozoides se colocaron nuevamente dentro de la cámara portátil y está a la vez dentro de baño maría por espacio de 18 horas para su fertilización.

3.3.4. Evaluación de fertilización y selección de cigotos

Los presuntos cigotos después de la fertilización fueron lavados (para separar de las células del cumulus y espermatozoides) dentro de

gotas de 0.5 mL de medio de cultivo compuesto de TCM-199 más el 10% de suero fetal que anteriormente fue estabilizada.

3.3.5. Cultivo embrionario

Los cigotos a las 24 horas pos fertilización en su mayoría aun no muestran división embrionaria, por lo cual se cultivaron por 2 días más para recién eliminar a los ovocitos no fertilizados.

Los tratamientos para el cultivo se describen en la siguiente tabla:

Cuadro 10: Medios de cultivo para el cultivo del 1er al 3er día pos fertilización.

Tratamiento	Medio	Suplementos
T1: SOF aa	(Fluido oviductal sintético)	+ 5 % de SFB + 10 uL de ATB
T2: KSOM aa	(Medio de optimización simples de potasio)	+ 5 % de SFB + 10 uL de ATB Se ajustó el pH a 7-7.4 con CO ₂
T3: TCM-199	(Medio de cultivo tisular)	+ 5 % de SFB + 10 uL de ATB

El cambio de cultivo se realizó cada 48 horas hasta el día 7; posterior al día 3, se procede a disminuir la cantidad de SFB de 5 a 2 %, así como también el medio KSOMaa al no tener en su composición el Buffer Hepes tiende a subir el pH, por lo cual al momento de la equilibración se ajustó el pH de 7-7.4 utilizando CO₂ en cantidades según sea el caso (0.2-0.5 cm³)

Cuadro 11: Adecuacion de los medios para el cultivo del 3er a 7mo día pos fertilización.

Tratamiento	Medio	Suplementos
T1: SOF aa	(Fluido oviductal sintético)	+ 2 % de SFB + 10 uL de ATB
T2: KSOM aa	(Medio de optimización)	+ 2 % de SFB + 10 uL de ATB

	simples de potasio)	Se ajustó el pH a 7 con CO ₂
T3: TCM-199	(Medio de cultivo tisular)	+ 2 % de SFB + 10 uL de ATB

Posterior al tercer día los ovocitos que presenten división celular a la evaluación con el microscopio estereoscopio, son desechados y los que se hayan dividido son cultivados hasta el día 9.

3.3.6. Evaluación de desarrollo embrionario

La evaluación embrionaria desde el día 7 se realizó teniendo en cuenta los siguientes estadios.

M= mórula temprana, MC= mórula compacta, BI= blastocisto inicial, BX= blastocisto expandido, ED= Embrión totalmente degenerado.

La descripción cualitativa y consiguiente clasificación de los embriones son evaluados por varios criterios, habiéndose adoptado por el International Embryo Transfer Society (IETS), que fue desarrollado por Linder y Wrigth (1983):

1 Excelente: Masa embrionaria esférica y simétrica, con células (blastómeros) uniformes en cuanto a tamaño, color y densidad. Al menos el 85% del material celular debería ser una masa embrionaria intacta y viable. La zona pelúcida deberá presentar superficies lisas.

2 Bueno: Irregularidades moderadas en cuanto al aspecto, forma, tamaño, color y densidad de las células. Al menos el 50% del material celular deberá encontrarse intacto y correspondería con una masa embrionaria viable

3 Regular: Irregularidades mayores en la forma y tamaño de la masa embrionaria, así como en el tamaño, color y densidad de células individuales. Al menos el 25% del material celular deberá encontrarse intacto y correspondería con una masa embrionaria viable.

4 Malo: Ovocito de 1 célula, degenerado, no viable

3.4. Método estadístico.

Las variables de estudio producción de embriones (tasa de mórulas y blastocisto), y calidad embrionaria (Excelente, bueno, regular y malo) se analizaron por la prueba de Chi-cuadrado dentro una tabla de contingencia de 3x2 y 3x4, utilizando el Software SPSS v.21.

Siendo la ecuación siguiente:

$$x^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^k \frac{(\theta_{ij} - e_{ij})^2}{e_{ij}}$$

Dónde:

θ_{ij} = Frecuencia observada.

e_{ij} = Frecuencia esperada.

k = Numero de columnas.

r = Numero de filas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Producción de embriones in vitro de alpacas en los medios de cultivo SOFaa, KSOMaa y TCM-199 en sus diferentes estados (mórula y blastocito) al séptimo día cultivo.

Los resultados de producción de embriones se midió contabilizando cigotos que llegaron a los estadios de mórula y blastocisto observándose en la tabla 1 donde en el tratamiento 1 SOFaa para el estadio de mórulas se obtuvo 20.7 % y blastocistos 14.9%; en el tratamiento 2 KSOMaa 15.2 % en mórulas y 8.9% de blastocistos y el tratamiento control con 12.8% y 5.8% respectivamente. En producción de embriones en el tratamientos SOFaa, KSOMaa y TCM-199 un total de embriones (31)35.6%, (23)26.7% y (16)18.6% respectivamente; analizando estadísticamente hay dependencia de la producción de embriones según el medio de cultivo ($p < 0.05$).

Tabla 1: Producción de embriones in vitro de alpacas a los 7 días de cultivo por tratamiento.

	T1SOF aa n (%)	T2KSOM aa n (%)	T3(contr ol) TCM - 199 n (%)
N° de cigotos cultivados	87	86	86
Mórulas	18 (20.7)	14 (16.2)	11 (12.8)
Blastocitos	13 (14.9)	9 (10.5)	5 (5.8)
Total	31 (35.6)	23 (26.7)	16 (18.6)

(P<0.05)

Ruiz et al. (2017) Realizaron un trabajo en alpacas donde evaluaron el efecto de la selección espermática y tensión de oxígeno durante el cultivo embrionario (SOFaa) y obtuvieron como mejor resultado una tasa de 29.7% de blastocistos al día 7 de cultivo con una tensión de oxígeno de 20%, del mismo modo afirma que la tensión de oxígeno no afecta la tasa de blastocistos. Los embriones de mamíferos se desarrollan bajo una menor tensión de oxígeno en el tracto reproductor femenino (Fisher y Bavister; 1993), y se ha publicado información completa sobre los beneficios de una baja tensión de oxígeno (es decir, 5 o 10%) durante el cultivo de embriones bovinos con o sin células alimentadoras (Harvey, 2007); estos resultados son superiores a los obtenidos en el presente trabajo, debido a que los autores controlaron la tensión de oxígeno y CO₂ en una incubadora convencional en nuestro caso no se adiciono oxígeno y la adición de CO₂ (gránulos efervescentes) se realizó por un cálculo aproximado.

Del Campo et al. (1994) realizaron un estudio en llamas utilizando los CCOs recuperados postmortem y fertilizaron con espermatozoides epididimales, el cultivo embrionario fue realizado en TCM-199 cocultivado con células del oviducto por 9 días donde obtuvo resultados de 17.3 % y el 18.6% de los cigotos que alcanzaron la etapa mórula y de blastocisto expandido, estos resultados son inferiores a los obtenidos en nuestros tratamientos; esto se debe a que las monocapas de células de oviducto deben prepararse cada semana a partir de oviductos de matadero

desconocidos, lo que supone un mayor riesgo de contaminación y una fuente de variación incontrolable (Xu et al, 1992).

Las transcripciones y proteínas del ovocito bovino rigen el desarrollo embrionario inicial después de la fertilización hasta el cuarto ciclo celular; en esta etapa, el control del genoma embrionario del desarrollo se hace evidente (De Sousa et al, 1998). Es posible que en los camélidos, el genoma embrionario, controlen el desarrollo del embrión antes que en las especies bovinas. Los propios embriones alteran la composición del medio y la naturaleza de tal cambio depende de varias variables, incluidas las especies de mamíferos y la etapa de Desarrollo embrionario, por lo tanto las condiciones de cultivo utilizadas no pueden considerarse estáticas. Los embriones de etapa posterior, como los blastocistos, son más activos que los estadios de cigoto y escisión, en consecuencia, tendrán un mayor impacto en la composición del medio (Gardner, 1998) Teniendo en cuenta estas teorías, Trasorras et al. (2014), utilizando ovocitos de llama aspirados por laparotomía que previamente fueron estimuladas con gonadotropinas y fertilizados con espermatozoides obtenidos por electro eyaculación, para el cultivo utilizaron fluido oviductal sintético (SOFaa) suplementado con 10% de SFB, renovándose el 50% cada 48 h, la evaluación de producción de embriones se realizó el día 6, donde obtuvieron una tasa de 34% de blastocistos, comparando nuestro sistema de cultivo que también se utilizó SOFaa suplementado con 5% de SFB son similares, sin embargo los resultados son superiores a los obtenidos en el presente trabajo, la explicación se debe a la influencia que tiene la estimulación ovárica que provee ovocitos más competentes para el desarrollo embrionario, en

cambio en nuestro caso se utilizó ovarios de alpacas beneficiadas en el camal y que se encuentran en diferentes fases del ciclo ovárico lo cual reduce nuestro porcentaje de embriones producidos *in vitro*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son menores a los obtenidos por Kathir et al. (2005) quienes realizaron un estudio en dromedarios (*Camelus dromedarius*), utilizando el medio de cultivo KSOMaa, obteniendo a los 7 días una tasa de 21% embriones que alcanzaron la etapa de blastocisto, este resultado comparado con nuestro trabajo se debe a que Kathir utilizó la suplementación de suero fetal en 10% a las 24 h iniciado el cultivo y se basa en la hipótesis del efecto bifásico del suero en un medio definido, que suprime el desarrollo del embrión en estadios tempranos y lo estimula en etapa de morula y blastocisto (Pinyopummintr y Bavister, 1991), en nuestro caso se adicionó 5% de SFB al inicio del cultivo embrionario razón por la cual probablemente no favoreció en el proceso de compactación de la mórula y la formación de blastocistos.

Por otro lado Nadambale et al. (2004) estudiaron el efecto de los medios de cultivo (SOFaa y KSOMaa) más la adición de BSA y suero fetal bovino en el cultivo de cigotos de bovinos; los resultados que obtuvieron fueron de 31% y 28% para SOFaa y KSOMaa respectivamente en blastocistos al día 7, estos autores indican la importancia de las macromoléculas como son el BSA y suero fetal bovino, por un lado el BSA tiene un efecto beneficioso en estadios iniciales no siendo así para el suero

fetal bovino que tiene un mejor efecto en estadios avanzados (morulación y blastulacion) (Tricoire et al, 1999)

Los resultados obtenidos por Mejia et al. (2009) quienes realizaron un estudio en bovinos utilizando el medio de cultivo KSOMaa comercial evolve®, obteniendo a los 7 días un porcentaje de embriones que alcanzaron la etapa de blastocistos 15%, e indica que los medios comerciales son fabricados en laboratorios certificados que utilizan insumos de alta calidad como también controlan osmoralidad, pH y otras características físicas de dichos medios de cultivo, contrastando con nuestro trabajo se utilizó insumos de diferentes marcas (Merck, sigma, spectrum) y además de ello no se tiene equipos para medir todos los parámetros biofísicos de cada medio de cultivo preparado en nuestro laboratorio. Se ha encontrado que cuando se utiliza en los medios de cultivo agua altamente purificada Milli-Q y recién obtenida la tasa de blastocistos bovina e significativamente más alta con respecto a otros tipos de agua como la clorhidratada, desionizada y la doblemente destilada (Nagao et al, 1995).

4.2. Evaluación de la producción de embriones in vitro de alpacas según calidad embrionaria en diferentes medios de cultivo(SOFaa, KSOMaa y TCM)

La evaluación de producción de embriones in vitro según calidad embrionaria se muestra en la tabla 2, dando como resultados en el tratamiento 1 SOFaa con (1) calidad excelente 16.1%, (2) calidad buena 13.8%, (3) calidad regular 5.7% y (4) calidad mala 64.4%; en el tratamiento

2 medio de cultivo KSOMaa en (1)calidad excelente 5.8%, (2) calidad buena 11.6 %, (3) calidad regular 9.3% y (4) calidad mala o degenerados 73.3% y en el tratamiento control TCM-199 donde 3.5% (1) calidad excelente, 8.1% (2) calidad buena, 7.0% (3) calidad regular y 63.5% (4) calidad mala; mostrando dependencia de la calidad embrionaria por efecto del medio de cultivo ($p < 0.05$).

Tabla 2: Clasificación según calidad de embriones producidos in vitro al séptimo día cultivados en diferentes medios.

		Medios de cultivo		
		T1 SOF aa (%)	T2 KSOM aa (%)	T3 TC M- 199 (%)
Calidad Embriona ria	Calida d excele nte Grado 1	14 (16.1)	5 (5.8)	3 (3.5)
	Calida d Buena Grado 2	12 (13.8)	10 (11.6)	7 (8.1)
	Calida d regular Grado 3	5 (5.7)	8 (9.3)	6 (7.0)
	Calida d mala Grado 4	56 (64.4)	63 (73.3)	70 (63.5)
Total de cigotos cultivados		87 (100)	86 (100)	86 (100)

($P < 0.05$)

La calidad embrionaria en los diferentes medios de cultivo se define a que un medio de cultivo adecuado tiene multiplicidad de condiciones de cultivo y el hecho de que los mismos embriones tienen diferentes

capacidades para lograr completar su desarrollo en un medio de cultivo en particular. No hay duda que los medios de cultivo embrionario afectan la calidad embrionaria, por lo que hasta la actualidad, no hay suficiente información para concluir cuál es el "mejor" de los medios o sistemas de cultivo, aunque es evidente que hoy en día, la mayoría de los medios de cultivo definidos o semidefinidos producen embriones de excelente calidad (85% del material celular debería ser una masa embrionaria intacta y viable). Sin embargo, no todos los embriones morfológicamente normales garantizan un mejor éxito durante el desarrollo después de la transferencia embrionaria (Millano et al, 2016)

La composición de los medios de cultivo afectan la calidad final del embrión, en nuestro caso al comparar el medio SOFaa y KSOMaa presentan una diferencia estadística ($p < 0.05$), ambos medios tienen cualidades benéficas en diferentes estudios (Nedambale et al, 2004, Khatir et al, 2005), esta situación podría deberse que la superioridad del medio SOFaa es que en su composición contiene HEPES un buffer que le confiere estabilidad en el pH al medio de cultivo en cambio el medio KSOMaa no contiene y el control de pH está supeditado por el bicarbonato de sodio por lo cual el pH no haya sido homogéneo durante tiempo de cultivo, el poder controlar este factor influyo directamente en la granulación de los embriones en los estadios de morula y blastocisto, que al final se traduce en una menor tasa de embriones de calidades aceptables (calidad 1 y calidad 2)(Gardner, 2008).

En el desarrollo in vivo en embrión recorre todo el largo del oviducto, según su desarrollo la composición del fluido oviductal cambia

y los requerimientos lo hacen de la misma forma, el embrión cuando se encuentra en el estadio de 2 células hasta 16, sus requerimientos energéticos principalmente son aportados por el piruvato y algunos aminoácidos (Gardner y Lesse, 1988). Sin embargo en estadios de mórula y blastocisto el consumo de energía se basa en la glucosa como principal fuente de energía, (Thompson y Peterson, 2000), la energía interviene en la expresión y desarrollo de la división celular. En el presente estudio las concentraciones de piruvato en el medio SOFaa fue de 0.33mM y del KSOMaa fue de 0.20 mM y de glucosa 1.5 mM y 0.2 mM respectivamente, comparando estas concentraciones en ambos casos, el KSOMaa posee menor concentración y además este medio se considera semi-definido y está sujeto a modificaciones, en cambio el medio SOFaa contiene mayores concentraciones razón por la cual se puede formular la hipótesis que este medio cumple con los requerimientos energéticos del embrión de alpaca.

V. CONCLUSIONES

El medio de cultivo SOFaa mas suplementación de SFB presenta mejores resultados frente a los medios (KSOMaa y TCM 199-control) en producción de embriones in vitro de alpacas al séptimo día.

La calidad embrionaria clasificada según las normas de la IETS, y comparadas entre los medios resalta que existe diferencia ($p < 0.05$), la razón se puede deber a la composición de los medios de cultivo y al control de los parámetros biofísicos.

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios de co-cultivo (células de la granulosa y células del epitelio oviductal), en los medios KSOMaa y SOFaa y evaluar el desarrollo embrionario.

Se recomienda no utilizar en altas cantidades el suero fetal bovino, ya que provoca reducción de la calidad embrionaria

Se recomienda utilizar medios de cultivo con alto contenido de bufferes que mantengan estable el pH.

Se recomienda el uso de factores de crecimiento tales como el IGF y EGF en el cultivo embrionario.

VII. REFERENCIAS

- Abdoon, A. (2001). Factors affecting follicular population, oocyte yield and quality in camels (*Camelus dromedarius*) ovary with special reference to maturation time in vitro. *Anim Reprod Sci* , 66: 71-79.
- Ahuja, C., Montiel, F., Pérez, P., & Gallegos, J. (2009). Medio alternativo para la producción in vitro de embriones bovinos. *Zootecnia Trop*, 27(3): 1-8.
- Arriaga, I., Huanca, W., Terreros, M., Becerra, J., García, P., & Ampuero, A. (2014). 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* , 25(4), 477-486.
- Bavister, B. (1995). Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1, 91–148.
- Berland, M., Von Baer, A., Ruiz, J., Parraguez, V., & Ratto, M. (2011). In vitro fertilization and development of cumulus oocytes complexes collected by ultrasound-guided follicle aspiration in superstimulated llamas. *Theriogenology*, 75: 1482–1488.
- Bó, G., & Mapletoft, R. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod.*, vol.10, No.3, 344-348.
- Bonilla, F., Dolz, M., Moreno, J., & Raga, F. (2009). Reproducción asistida: abordaje en la práctica clínica. *Editorial Medica Panamericana*, Buenos Aires.
- Bustinza, V. (2001). *La Alpaca: Crianza, Manejo y Mejoramiento*. Puno: Sección Publicaciones Oficina de Recursos de Aprendizaje.
- Cardellino, R., & Rovira, J. (1987). *Mejoramiento genético animal*. Uruguay: Hemisferio Sur.
- Carretero, M., Miragaya, M., Chaves, M., Gambarotta, M., & Agüero, A. (2010). Embryo production in superstimulated llamas pretreated to inhibit follicular growth. *Small Rum. Research*, 88: 32-37.
- Conde, P., Herrera, C., Trasorras, V., Giuliano, S., Directo, A., Miragaya, M., . . . Pasqualini, S. (2008). In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Animal Reproduction Science* , 109: 298 – 308.
- De Sousa, P., Watson, A., Schultz, G., & Bilodeau, S. (1998). Oogenetic and zygotic gene expression directing early bovine embryo-genesis. *A review. Mol. Reprod. Dev*, 51, 112–121.
- Del Campo, M., Del Campo, C., Donoso, M., Berland, M., & Mapletoft, R. (1994). In vitro fertilization and development og Lama glama oocytes using

- epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology*, 41: 1219-1229.
- Del Campo, M., Donoso, M., & Del Campo, C. (1992). In vitro maturation of Llama (Lama glama) oocytes. *Proc 12th Int Cong Anim Reprod*, vol 1, p 324.
- Edwards, L., Batt, P., Gondolfi, F., & Gardner, D. (1997). Modifications made to the culture medium by bovine oviduct epithelial cells: changes to carbohydrates stimulate bovine embryo development. *Mol Reprod Dev* 46, 146–154.
- Fischer-Brown, A., Crooks, A., Leonard, S., Monson, R., Northey, D., & Rutledge, J. (2005). Parturition following transfer of embryos produced in two media under two oxygen concentrations. *Animal Reproduction Science* 87, 215–228.
- Fisher, B., & Bavister, B. (1993). Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil*, 99: 673-679.
- Galina, C., & Valencia, J. (2011). Reproducción de animales domésticos. 38 ed. México: Limusa, S.A.
- Gamarra, G., Gallegos, A., Alvarado, E., Asparrin, M., & Vivanco, W. (2008). First in vitro embryo production in alpacas (Lama pacos). *Reproduction, Fertility and Development*, 21, 177– 178.
- Gardner, D. (2008). Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristic. *Reprod Fertil Dev*, 20, 9-18.
- Gardner, D., & Leese, H. (1988). The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. *Development*, 104:423-429.
- Giuliano, S., & Trasorras, V. (2011). Producción in vitro de embriones de camélidos sudamericanos. *SPERMOVA*, 1(1): 60-61.
- Gordon, I. (2003). Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, UK: CAB.
- Hafez, E. (2002.). Reproducción e inseminación artificial en animales. Edit. MC Graw Hill, 78ed. España.
- Harvey, A. (2007). The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Anim Reprod Sci*, 98: 113-128.
- Huanca, W., Cárdenas, O., Olazábal, C., Ratto, M., & Adams, G. (2001). Efecto hormonal y empadre sobre el intervalo a la ovulación en llamas. *Rev Inv Vet Perú*, (Supl 1): 462- 463.
- Huanca, W., Condori, R., Chileno, M., Garcia, P., Cainzo, J., & Becerra, J. (2014). Evaluación de cuatro tiempos de cultivo sobre la tasa de maduración y división pos fecundación in vitro de ovocitos de alpaca. *Rev Inv Vet Peru*, 25(4), 468-476.

- Huanca, W., Cordero, A., & Huanca, T. y. (2007). Biotecnologías reproductivas en Camelidos Sudamericanos domesticas: avances y perspectivas. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* , Vol. 15.
- Huanca, W., Ratto, M., Cordero, A., Santiani, A., Huanca, T., Cárdenas, O., & Adams, G. (2006a). Respuesta ovárica y transferencia de embriones en llamas y alpacas en la zona altoandina del Perú. *Memorias del IV Congreso Mundial de Camélidos*.
- Khatir, H., Anouassi, A., & Tibary, A. (2004). Production of dromedary (*Camelus dromedarius*) embryos by IVM and IVF and co-culture with oviductal or granulosa cells. *Theriogenology* , 62: 1175- 118.
- Khatir, H., Anouassi, A., & Tibary, A. (2005). In vitro and in vivo developmental competence of dromedary (*Camelus dromedarius*) embryos produced in vitro using two culture systems (mKSOMaa and oviductal cells). *Reprod Dom Anim*, 40:245–9.
- Krisher, R., Lane, M., & Bavister, B. (1999). Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biol Reprod*, 60,1345-1352.
- Lawitts, J., & Biggers, J. (1991). Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods. *J Reprod Fertil* 91, 543–546.
- Lee, P., Elhassan, M., & Kraemer, C. (1999). The effect of b-mercaptoethanol and N-acetyl cysteine on development and hatching of bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology* , 51, 243.
- Linder, G., & Wright, R. (1983). Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* , 20 (4): 407-416p.
- Liu, Z., & Foote, R. (1995). Effects of amino acids on the development of in vitromaturation/ in-vitro fertilization bovine embryos in a simple protein-free medium. *Hum Reprod* 10, 2985–2991.
- Mejía, V., Arango, S., Pareja, A., Camargo, O., & Urrego, R. (2009). Evaluación de dos medios de cultivo sobre la producción in vitro de embriones bovinos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, vol. 4, núm. 2, pp. 39-46.
- Mendoza, J., Ayuque, A., Triviño, F., Ayuque, G., Yaranga, M., Landeo, L., . . . Ruiz, J. (2008). Evaluación de dos métodos de separación de espermatozoides epididimarios para la fecundación in vitro de ovocitos de alpaca. *XXXI Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal-APPA*.
- Mendoza, J., Landeo, L., Yauri, M., Manrique, L., Molina, R., Castañeda, F., . . . Ruiz, J. (2013). Experiencias preliminares de gestación en alpacas y llamas con transferencia de embriones de alpacas producidos in vitro. *XXXVI Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal*, Lima – Perú.

- Mermillod, P., Boccart, C., Wils, C., & Dessy, F. (1992). Effect of oviduct conditioned medium and cumulus cells on bovine embryo development in vitro. *Theriogenology*, 37, 256.
- Millano, Z., Rosell, L., Urribarrí, Y., Sánchez, R., Báez, F., & Villamediana, P. (2016). Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la producción in Vitro de embriones Bos taurus x indicu. *Revista Científica*, vol. XXVI, núm. 3, pp. 173-180.
- Miragaya, M. H., & Agüero, A. (2003). Producción in vitro de embriones de llama (Lama glama) por la técnica de ICSI. *III Congreso Mundial Sobre Camélidos y I Taller Internacional de DECAMA*, Potosí, Bolivia.
- Miragaya, M., Chaves, G., & Agüero, A. (2006). Reproductive biotechnology in South American Camelids. *Small Ruminant Research*, 61: 299-310.
- Nagao, Y., Sacki, K., Hoshi, M., Takahashi, Y., & Kanagawa, H. (1995). Effects of water quality in vitro fertilization and development of bovine oocytes in protein-free medium. *Theriogenology*, 44: 433-444.
- Nedambale, T., Groen, W., & Yang, X. (2002). Comparison between KSOM and SOFaaci for in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 57, 523.
- Nedambale, T., Tshimangadzo, L., Dinnye's, A., Xiangzhong, Y., & Tian, C. (2004). Bovine Blastocyst Development in vitro: Timing, Sex, and Viability Following Vitrification. *Biology of Reproduction*, 71: 1671-1676p.
- Novoa, C., & Leyva, V. (1996). Reproducción en alpacas y llamas. *Fondo Contravalor Perú-Suiza, CISA/IVITA*, N°26, 30 p.
- Palasz, A., Tornesi, M., Archer, J., & Mapletoft, R. (1995). Media alternatives for the collection, culture and freezing of mouse and cattle embryos. *Theriogenology*, 44:705-714.
- Palma, G. (2001). Biotecnología de la reproducción. *Edit. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*, Argentina.
- Palma, G., & Brem, G. (1993). Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en especie Bovina. *Editorial Hemisferio Sur. Argentina*, 129-142p.
- Parrish, J., Susko-Prurish, J., Winer, M., & First, N. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology Reproduction*, 38, 1171-1180.
- Pérez, M., Apaza, E., & Deza, H. (2006). Congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de camélidos. Allpaqa. *Revista de Investigación del IIPC, Vol 11(Nro 01)*, pp 17-23.
- Pérez, M., Zevallos, J., & Perez, U. (2017). Comparación de sistemas de cultivo de embriones de alpacas. *Rev. Investig. Altoandin*, Vol 19 N° 2: 157 – 164.

- Pinyopummintr, T., & Bavister, D. (1994). Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology*, ;41:1241–49.
- Ratto, M., Berland, M., Huanca, W., Singh, J., & Adams, G. (2005). In vitro and in vivo maturation of llama oocytes. *Theriogenology*, 63: 2445-2457.
- Ratto, M., Gómez, C., Berland, M., & Adams, G. (2007). Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Animal Reproduction Science*, 97: 246-256.
- Rosenkras, C., Zeng, G., Namara, G., Schoff, P., & Fisrt, N. (1993). Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol Reprod*, 49, 459–462.
- Ruiz, J., Correa, J., Ayuque, G., Landeo, L., Yaranga, M., & Zacarías, A. (2007). Producción in vitro de embriones partenogénéticos de alpaca y llama . / *Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica, Perú.*
- Ruiz, J., Santayana, P., Mendoza, J., Landeo, L., Huamán, E., Ticllacuri, F., . . . Ratto, M. (2017). Effect of oocyte maturation time, sperm selection method and oxygen tension on in vitro embryo development in alpacas. *theriogenology*, 03.006.
- Sansinema, M., Taylos, S., Taylor, P., Schmidt, E., Denniston, R., & Godke, R. (2007). In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Animal Reproduction Science*, 99: p342-353.
- SENAMHI. (2017). Servicio Nacional de Metereologia e Hidrologia. *Dirección Regional Puno. Perú.*
- Suzuki, T., Sumantri, C., Khan, N., Murakami, M., & Saha, S. (1999). Development of a simple, portable carbon dioxide incubator for in vitro production of bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 53, 149-157.
- Tavares, L., Magnusson, V., Misen, V., Lima, A., H., C., & Visintin, J. (2002). Development of in vitro-matured and fertilized bovine embryos cultured in CR2aa, KSOMaa and SOFaa. *Theriogenology*, 57, 528.
- Taylor, P. (2003). Practical embryo transfer in the South American camelids. *III Congreso Mundial sobre Camélidos, Potosí–Bolivia.*
- Tervit, H., Whittingham, D., & Rowson, L. (1972). Successful culture in vitro sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*, 30:493–7.
- Thompson, J., & Peterson, J. (2000). Bovine embryo culture in vitro:New developments and post-transfer consequences. *Hum. Reprod*, 15:59-67.
- Trasorras, V., Castex, C., Alonso, A., Giuliano, S., Cruz, R., Arraztoa, C., . . . Miragaya, M. (2014). First llama (*Lama glama*) pregnancy obtained after

in vitro fertilization and in vitro culture of gametes from live animals. *Animal Reproduction Science*, 148, (1-2): 83–89.

- Trasorras, V., Chaves, M., Miragaya, M., Pinto, M., Rutter, B., Flores, M., & Agüero, A. (2009). Effect of eCG Superstimulation and Buserelin on Cumulus-oocyte complexes recovery and Maturation in llamas (*Lama glama*). *Reproduction in Domestic Animals*, 44: 359-364.
- Tricoire, H., Touze, J., & Mermillod, P. (1999). Effect of fetal calf serum on the quality of in vitro produced cattle embryos. *Theriogenology*, 51:257.
- Vasquez, N., Perez, M., Olivera, L., & Perez, U. (2015). Efecto de dos métodos de colección sobre la cantidad y calidad ovocitaria de alpacas (*Vicugna pacos*) y Llamas (*Lama glama*) POSTMÓRTEM . *Rev. Investig. Altoandin* , Vol.17 N° 3: 331-340.
- Vilela, J. (2014). *Mejoramiento genético en animales domésticos*. Lima: Empresa Editora Macro E.I.R.L.
- Wani, N., & Hong, S. (2018). Intra cytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vitro matured oocytes with stored epididymal spermatozoa in camel (*Camelus dromedarius*): Effect of exogenous activation on in vitro embryo development. *theriogenology*.
- Xu, P., Yadav, R., Rorie, W., Plante, L., Betteridge, J., & King, A. (1992). Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro and cocultured with bovine oviductal epithelial cells. *J Reprod Fertil*, 94, 33–43.
- .
- .

ANEXOS

ANEXO A

RESULTADOS DE PRODUCCION DE EMBRIONES IN VITRO

Tabla 3: Resultados de desarrollo embrionario en medio KSOM.

	Fecha de maduración	N° de ovocitos	N° de cigotos	Evaluación 7mo día (Mórulas y blastocistos)*	Observaciones
	04/06/17	26	9	BX1, Mc2, M3	
	11/05/17	44	17	B2, Bi2, Mc2, M2	
	18/05/17	27	10	B1, M3, Bi3	
	25/05/17	32	11	Mc1, BX1, M3	
	08/06/17	41	16	M2, M2, Bi3, B3	
	15/06/17	29	10	B1, M2, Mc3	
	29/06/17	39	13	Mc2, M3, Mc2	
TOTAL			86	23	

Tabla 4: Resultados de desarrollo embrionario en medio SOFaa.

	Fecha de maduración	N° de ovocitos	N° de cigotos	Evaluación 7mo día (Mórulas y blastocistos)	Observaciones
	28/02/17	19	6	M1, M2, Bi1	
	21/03/17	47	16	Bi1, B2, Mc2, M3	
	23/03/17	16	6	Mc1, M3, B3	
	30/03/17	24	9	BX1, M1, Mc2	
	27/04/17	35	12	Mc1, Mc2, BX1, B2	

	06/07/17	29	11	Mc1, Bi2, M2, M1	
	13/07/17	18	7	B3, M3, M2	
	03/08/17	20	7	Mc1, B1.Bi2	
	17/08/17	37	13	M1, M2, BX1, B2	
TOTAL			87	31	

Tabla 5: Resultados de desarrollo embrionario en medio (TCM-199).

	Fecha de maduración	N° de ovocitos	N° de cigotos	Evaluación 7mo día (Mórulas y blastocistos)	Observaciones
	20/07/17	19	7	B1,M3	
	27/07/17	30	13	Mc2,M2	
	01/08/17	21	8	BX2,MC3	
	24/08/17	29	12	M1,Mc3	
	07/09/17	34	15	Mc2,M2,B3	
	14/09/17	42	19	BX1,M2,Mc3	
	21/09/17	28	12	Bi2,M3	
TOTAL			86	16	

* M: Mórula, Mc: Mórula compacta, Bi: Blastocisto inicial, B: Blastocisto, Bx: Blastocisto expandido

ANEXO B

PRUEBAS ESTADÍSTICAS

Tablas de contingencia para tratamientos y producción de embriones (mórulas y blastocistos).

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Producción de embriones * Medios de cultivo	259	100,0%	0	0,0%	259	100,0%

Tabla de contingencia Producción de embriones * Medios de cultivo

			Medios de cultivo			Total
			SOFaa	KSOMaa	TCM 99 (control)	
Producción de embriones	Degenerado	Recuento	56	63	70	189
		Frecuencia esperada	63,5	62,8	62,8	189,0
		% dentro de Producción de embriones	29,6%	33,3%	37,0%	100,0%
		% dentro de Medios de cultivo	64,4%	73,3%	81,4%	73,0%
		% del total	21,6%	24,3%	27,0%	73,0%
		Recuento	31	23	16	70
	Embrión desarrollado(M y B)	Frecuencia esperada	23,5	23,2	23,2	70,0
		% dentro de Producción de embriones	44,3%	32,9%	22,9%	100,0%
		% dentro de Medios de cultivo	35,6%	26,7%	18,6%	27,0%
		% del total	12,0%	8,9%	6,2%	27,0%
		Recuento	87	86	86	259
		Frecuencia esperada	87,0	86,0	86,0	259,0
Total	% dentro de Producción de embriones	33,6%	33,2%	33,2%	100,0%	
	% dentro de Medios de cultivo	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
	% del total	33,6%	33,2%	33,2%	100,0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	6,363 ^a	2	,042
Razón de verosimilitudes	6,430	2	,040
Asociación lineal por lineal	6,335	1	,012
N de casos válidos	259		

a. 0 casillas (0,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 23,24.

Se rechaza la hipótesis nula ($p < 0.05$), la ji cuadrada calculada es mayor que la ji tabular, por lo tanto las variable producción de embriones es dependiente de los medios de cultivo.

Tablas de contingencia para tratamientos y calidad embrionaria

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Medios de cultivo * Calidad embrionaria	259	100,0%	0	0,0%	259	100,0%

Tabla de contingencia Calidad embrionaria * Medios de cultivo

		Medios de cultivo			Total	
		SOFaa	KSOMaa	TCM 99 (control)		
Calidad embrionaria	Excelente	Recuento	14	5	3	22
		Frecuencia esperada	7,4	7,3	7,3	22,0
		% dentro de Calidad embrionaria	63,6%	22,7%	13,6%	100,0%
		% dentro de Medios de cultivo	16,1%	5,8%	3,5%	8,5%
	% del total	5,4%	1,9%	1,2%	8,5%	
	Bueno	Recuento	12	10	7	29
		Frecuencia esperada	9,7	9,6	9,6	29,0
		% dentro de Calidad embrionaria	41,4%	34,5%	24,1%	100,0%
		% dentro de Medios de cultivo	13,8%	11,6%	8,1%	11,2%
	% del total	4,6%	3,9%	2,7%	11,2%	
	Regular	Recuento	5	8	6	19
		Frecuencia esperada	6,4	6,3	6,3	19,0
		% dentro de Calidad embrionaria	26,3%	42,1%	31,6%	100,0%
		% dentro de Medios de cultivo	5,7%	9,3%	7,0%	7,3%
	% del total	1,9%	3,1%	2,3%	7,3%	
Malo	Recuento	56	63	70	189	
	Frecuencia esperada	63,5	62,8	62,8	189,0	
	% dentro de Calidad embrionaria	29,6%	33,3%	37,0%	100,0%	
	% dentro de Medios de cultivo	64,4%	73,3%	81,4%	73,0%	
% del total	21,6%	24,3%	27,0%	73,0%		
Total	Recuento	87	86	86	259	
	Frecuencia esperada	87,0	86,0	86,0	259,0	
	% dentro de Calidad embrionaria	33,6%	33,2%	33,2%	100,0%	
	% dentro de Medios de cultivo	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
% del total	33,6%	33,2%	33,2%	100,0%		

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	12,920 ^a	6	,044
Razón de verosimilitudes	12,537	6	,051
Asociación lineal por lineal	10,085	1	,001
N de casos válidos	259		

a. 0 casillas (0,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 6,31.

Se rechaza la hipótesis nula ($p < 0.05$), la ji cuadrada calculada es mayor que la ji tabular, las variable calidad embrionaria es dependiente de los medios de cultivo

ANEXO C

EQUIPOS, MATERIALES Y MEDIOS

Equipos de laboratorio

- Balanza analítica
- Platina calentadora
- Microscopio estereoscópico
- Microscopio invertido
- Microscopio óptico estándar
- Estufa de secado
- Micro dispensador de 10 μ L
- Termómetro digital
- Baño maría
- Cámara de flujo laminar
- Vortex
- Centrifuga
- Congeladora de -40°C
- Refrigeradora
- Cocina eléctrica
- Termos de agua caliente

Materiales de laboratorio

- a) Materiales para producción y manejo de embriones:
- Cámara portátil (taper)
 - Aguja hipodérmica de 20 G x 1, 23 G x 1
 - Filtros de poro de 22 μm

- Matraz Erlenmeyer de 500 y 1000 mL
- Jeringas de tuberculina
- Jeringas de 5, 10, 20 y 60 mL.
- Tips de 10 μ L,
- Placas Petri de 2 y 4 pocillos
- Placas Petri pequeñas de 33 x 10 mm
- Tubos de ensayo de 10 mL
- Tubos Falcón
- Probetas graduadas de 100 mL
- Porta y cubre objetos
- Indumentaria de bioseguridad(Mandil, Guantes, barbijo, gorro)

Medios:

- Suero fisiológico
- Agua bi destilada
- Agua ultrapura
- Agua des ionizada
- Medio de cultivo tisular TCM-199 (Medium 199 – M2520 - 1L SIGMA ®)
- Solución medio stock tyrode lactato modificado SPERM-TALP
- Solución medio stock tyrode lactato modificado FERT-TALP
- Medio de cultivo SOFaa(Fluido oviductalsintético)
- Medio de cultivo KSOM aa(Medio de optimización simple de potasio)

ANEXO D
FIGURAS



Figura 1: Colección de ovocitos en el camal de Ayaviri



Figura2: Ovarios colectados en suero fisiológico + antibióticos a 35 °C.



Figura: 4 Lavado de ovario con solución fisiología

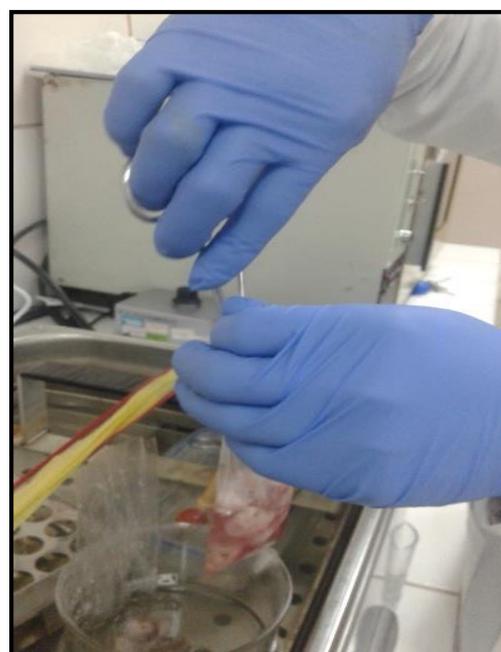


Figura: 3 Selección de ovarios de alpaca



Figura: 6 Ovario con folículo dominante

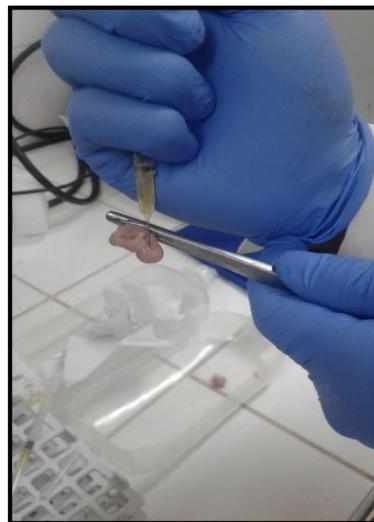


Figura: 5 Aspiración de COCs

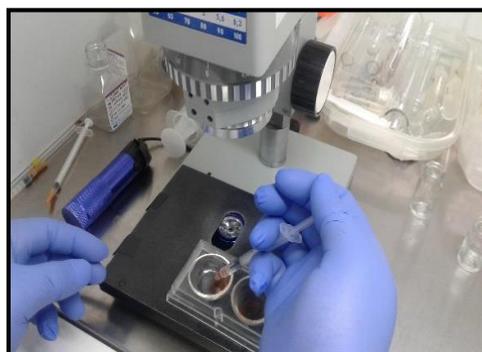


Figura: 7 Medio de maduración en placas de 2 pocillos

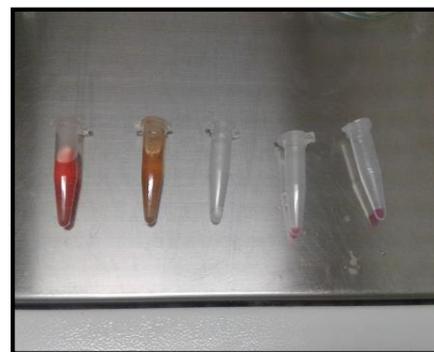


Figura: 8 Preparación de medios de maduración



Figura: 10 Preparación de medio de fertilización

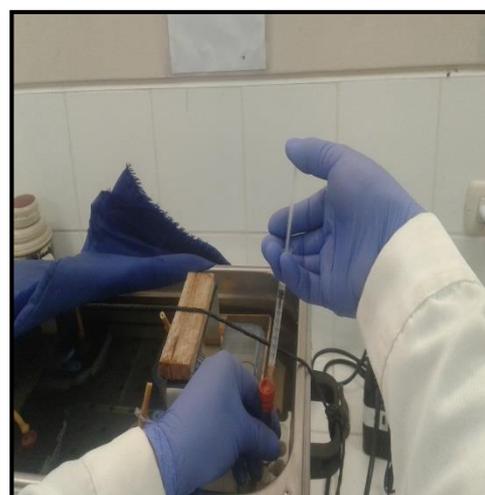


Figura: 9 Espermatozoides en swim up



Figura: 12 Preparación de medio de cultivo.

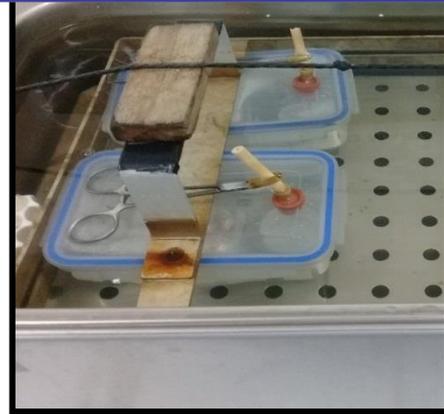


Figura: 11 Cámara de incubación portátil sumergida en baño maria

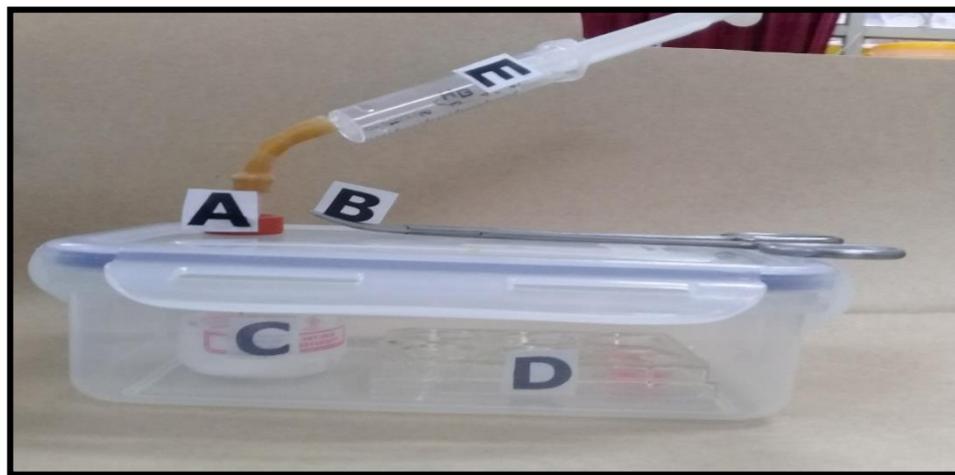


Figura: 13 Cámara de incubación portátil
A: Válvula de control B: pinza hemostática C: depósito de gránulos efervescentes
D: Placa de cultivo E: Jeringa con agua desionizada

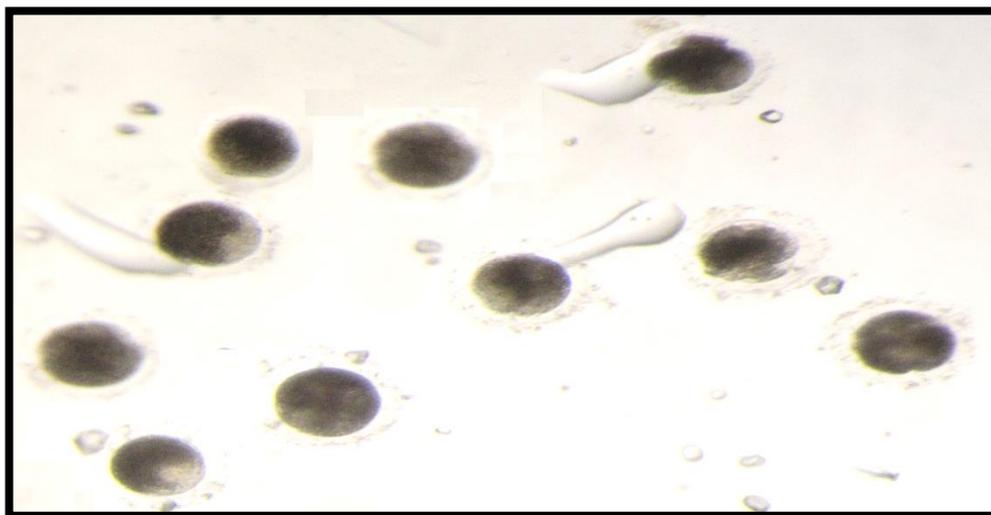


Figura: 14 Cigotos cultivados 24 horas pos fertilización.

EMBRIONES DE ALPACAS

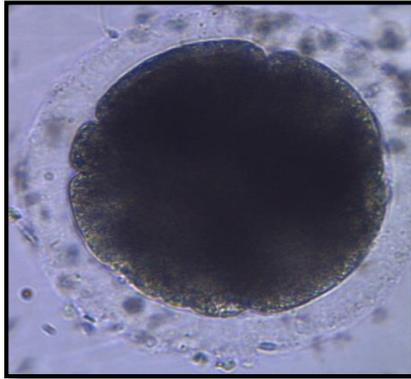


Figura: 15 Mórula.

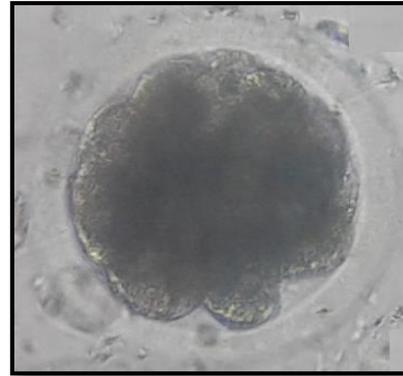


Figura: 16 Mórula compacta.

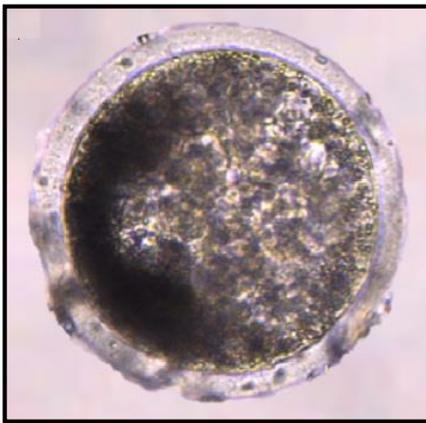


Figura: 18 Blastocisto inicial.

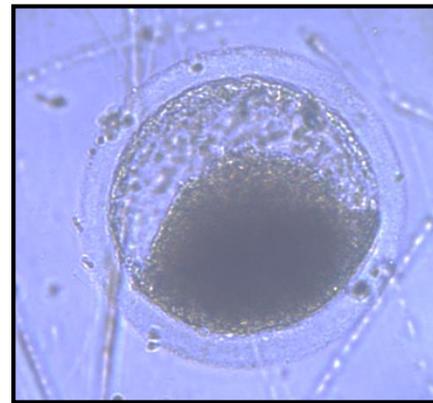


Figura: 17 Blastocisto.



Figura: 19 Blastocisto expandido.



Figura: 20 Blastocisto expandido.