

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



**“EFECTO DE LAS GONADOTROPINAS EN LA MADURACIÓN Y
FERTILIZACIÓN DE OVOCITOS EN ALPACAS (*Vicugna pacos*)”**

PRESENTADO POR EL BACHILLER:

MIGUEL HUMBERTO PACOMPIA TORRES

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNIA

PUNO – PERÚ

2017

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

TESIS

"Efecto de las gonadotropinas en la maduración y fertilización de ovocitos en alpacas (*vicugna pacos*)"

PRESENTADO POR EL BACHILLER:

MIGUEL HUMBERTO PACOMPIA TORRES



PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

APROBADA POR:

PRESIDENTE	:	 _____ Mg. Sc. Bilo Wenceslao Calsin Calsin
PRIMER MIEMBRO	:	 _____ MVZ. Wilbur Ruben Ayma Flores
SEGUNDO MIEMBRO	:	 _____ Mg. Sc. Nubia Lilia Catacora Flores
DIRECTOR	:	 _____ Dr. Manuel Guido Perez Durand
ASESOR	:	 _____ Mg. Sc. Uri Harold Perez Guerra

Área : Reproducción animal

Tema : Conservación de gametos

DEDICATORIA

A Dios, Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

A mi novia Ericka y mis hermanos Karina y Enrique por ser la razón de mi superación y por apoyarme y ver en ellos un futuro mejor.

A mis familiares y los familiares de mi novia por brindarme su apoyo incondicional cada día.

A la memoria de un angelito que siempre está a mi lado y me protege con su mano divina mi hermana Ivone que está en el cielo.

Miguel Humberto Pacompia Torres

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, ya que sin su buen guiar no hubiera sido posible el desarrollo de este trabajo.

A la gloriosa Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano por la formación profesional recibida.

Mi especial reconocimiento y gratitud Al Dr. Manuel Guido Perez Durand, al personal del Camal Municipal de Ayaviri quienes me brindaron su apoyo absoluto.

A mis amigos/as Armando, Percy, Máximo, Marck, Dalvert, Yony, David, Elmer, Wilbert, Emanuel, Gerson, Ronald, Alex, Raúl, Víctor, Amilcar, Chano, Walon, Levinger, Mery, Huziel quienes me compartieron su amistad y compañerismo en la vida Universitaria.

A todos quienes confiaron en mí.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	9
ABSTRACT.....	10
I. INTRODUCCIÓN.....	11
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	13
2.1. Maduración del ovocito:	13
2.2. Maduración <i>in vitro</i>	18
2.3. Fertilización <i>in vitro</i> :.....	24
2.4. Antecedentes de maduración y fertilización <i>in vitro</i> en camelidos sudamericanos.	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1. Lugar de estudio.....	32
3.2. Material de estudio	32
3.3. Metodología:.....	32
3.4. Prueba estadística	38
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1. Efecto de las gonadotropinas (FSH y LH) sobre la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos de alpaca.....	39
4.2. Efecto de los espermatozoides procedentes del conducto deferente sobre la fertilización <i>in vitro</i> en ovocitos de alpaca.....	41
V. CONCLUSIONES.....	45
VI. RECOMENDACIONES	46
VII. REFERENCIAS	47
VIII. ANEXOS.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Porcentaje de maduración de ovocitos de alpaca con dos concentraciones de gonadotropinas 1:5 UI y 2:10 UI (FSH: LH).....	41
Figura 2: Porcentaje de fertilización de ovocitos madurados 1:5 y 2:10 (FSH:LH) y fertilizados con espermatozoides provenientes del epididmo.	43
Figura 3: Recolección de ovocitos en el camal	58
Figura 4: Recolección de suero fetal bovino	58
Figura 5: Maduración de ovocitos en medio TCM-199 suplementado	59
Figura 6: Maduración de ovocitos en medio TCM-199 suplementado con SFB y 2:10 (FSH:LH)	59
Figura 7: Espermatozoides obtenidos del conducto deferente	60
Figura 8: Co-cultivo de ovocito maduro y espermatozoides procedentes del conducto deferente.....	60
Figura 9: ovocitos que fueron madurados con suplementación de 1:5 (FSH:LH) y que fueron fertilizados por espermatozoides procedentes del conducto deferente.....	61
Figura 10: ovocitos que fueron madurados con suplementación de 2:10 (FSH:LH) y que fueron fertilizados por espermatozoides procedentes del conducto deferente	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Distribución de los ovocitos en los tratamientos	32
Tabla 2: Maduración in vitro de ovocitos de alpaca expuestas a diferentes concentraciones de FSH y LH.	39
Tabla 3: Porcentaje de fertilización de ovocitos madurados con 1:5 UI (FSH) y 2:10 UI (FSH: LH) con espermatozoides procedentes del conducto deferente (2x10esp.)	42
Tabla 4: REGISTRO DE MADURACION Y FERTILIZACION IN VITRO	62
Tabla 5: Prueba de Ji-cuadrada para maduración de ovocitos.....	63
Tabla 6: Prueba de Ji-cuadrada para fertilización de ovocitos.....	63
Tabla 7: Medio de Maduración TCM-199 Earle´s salts Disuelva en 1 Lt de DD-agua y agregue 2.2 gr de Bicarbonato de Sodio. Filtre con filtros 0.22 um y guarde en botellas de vidrio. MADURACION DE LOS COC SOLUCION DE TRABAJO	64
Tabla 8: Medio de Fertilización FERT-TALP SOLUCION DE TRABAJO.....	64

ÍNDICE DE ACRONIMOS

- ATB = Antibiótico
- PBS = Solución buffer fosfato
- FSH = Hormona folículo estimulante
- LH = Hormona luteinizante
- TCM = Medio de cultivo tisular
- uL = Micro litro
- esp./mL = Espermatozoides por mililitro
- mM = Mili molar
- mL = Mililitro
- PHE = Penicilamina, Hipotaurina, Epinefrina
- mg = Microgramo
- °C = Grados centígrados
- L = Litro
- HEPES = Solución tampón
- AMPc = Adenosin Monofosfato Ciclico
- CO₂ = Dióxido de carbono
- mm = milímetro
- UI = Unidad Internacional
- eCG = Gonadotropina corionica equina
- hCG = Gonadotropina corionica humana
- FIV = Fertilización *in vitro*
- MIV = Maduración *in vitro*

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de las gonadotropinas en la maduración y fertilización de ovocitos en alpacas (*Vicugna pacos*). Se obtuvieron 65 ovarios procedentes de alpacas beneficiadas en el camal Municipal de Ayaviri y trasladados en PBS + ATB a 37°C. Se aspiraron 590 ovocitos, del total se seleccionaron 249. Los ovocitos selectos fueron divididos en dos grupos: 125 en el tratamiento con 1:5 (FSH:LH) y 124 en el tratamiento con 2:10 (FSH:LH), ambos grupos fueron madurados con medio TCM suplementados con 10% de Suero Fetal Bovino y sometidos a 38.5°C, 5% de CO₂ y 100% de humedad por 36 horas. Obteniéndose una maduración para el primer grupo de 71.2% (89/125) y en el segundo grupo el 74% (92/124). Por otra parte en la fertilización *in vitro* se trabajó con espermatozoides del conducto deferente en una concentración de 2x10⁶esp./mL y capacitados en 2 uL de heparina (1 mg/mL) y 2 mL de PHE/2 mM de penicilamina, 1mM hipotaurina y 250 mM de epinefrina; obteniéndose, 60.7% de fertilización para los ovocitos madurados con 1:5 (FSH:LH) y 64.1% en los ovocitos madurados con 2:10 (FSH:LH). Los resultados fueron sometidos a la prueba de Ji-Cuadrado, observándose que no hay diferencia significativa a una (p>0.05). Los resultados sugieren que la elevada maduración y fertilización *in vitro* en ovocitos de alpaca demuestran que el medio, suplementos y las condiciones de cultivo utilizados en el presente estudio, son aptos y proveen las condiciones necesarias para los distintos procesos fisiológicos requeridos.

PALABRAS CLAVE: Alpacas, fertilización, gonadotropinas, maduración, ovocitos.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the effect of gonadotropins on the maturation and fertilization of oocytes in alpacas (*Vicugna pacos*). A total of 65 ovaries were obtained from alpacas benefited in the municipal campa of Ayaviri and transferred in PBS + ATB at 37 ° C. 590 oocytes were aspirated, 249 were selected from the total. Selected oocytes were divided into two groups: 125 in the treatment with 1: 5 (FSH: LH) and 124 in the treatment with 2:10 (FSH: LH), both groups were matured with TCM medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum and subjected to 38.5 ° C, 5% CO₂ and 100% Humidity for 36 hours. A maturation was obtained for the first group of 71.2% (89/125) and in the second group 74% (92/124). On the other hand, in vitro fertilization, spermatozoa of the vas deferens were used in a concentration of 2x10⁶ sp./mL and trained in 2 uL of heparin (1mg / mL) and 2 mL of PHE / 2 mM of penicillamine, 1 mM hypotaurine and 250 mM epinephrine ; (FSH: LH) and 64.1% in oocytes matured with 2:10 (FSH: LH). The results were submitted to the Chi-Square test, observing that there was no significant difference to one ($p > 0.05$). The results suggest that the high in vitro maturation and fertilization in alpaca oocytes demonstrate that the medium, supplements and cultivation conditions used in the present study are apt and provide the necessary conditions for the different physiological processes required.

KEYWORDS: Alpacas, fertilization, gonadotropins, maturation, oocytes.

I. INTRODUCCIÓN

La población de alpacas en el Perú es de 3'685,500; de los cuales, una mayor proporción es para la raza Huacaya con 78.9% seguida por la raza Suri con 12.00% (INEI, 2012). Constituyen un importante componente de la actividad socioeconómica de un gran sector de la población andina de Perú; siendo la producción de fibra una de las principales fuentes de ingreso económico en estas poblaciones. Las deficiencias en los esquemas de manejo reproductivo han contribuido a un deterioro de la calidad de los animales (Huanca, 2012).

El desarrollo de tecnologías reproductivas como la Inseminación Artificial, Transferencia de embriones y Fecundación *in vitro*, se presentan como importantes alternativas para contribuir a mejorar la calidad genética en un menor tiempo. La técnica de fertilización *in vitro* (FIV) es una de las tecnologías de mayor desarrollo en los últimos años (Huanca, 2012) e involucra el control de los mecanismos de maduración e interacción de los gametos femenino y masculino en un ambiente artificial (Filipiak y Larocca, 2010). La utilización de la fecundación *in vitro* en camélidos sudamericanos podría ser una alternativa para el mejoramiento genético de camélidos domésticos y para la preservación de los camélidos silvestres (Ruiz, 2011); sin embargo, existen pocos reportes de FIV en estas especies: Del Campo *et al.* (1994), Del Campo *et al.* (1995), Gómez *et al.* (2002), Conde *et al.* (2006), Ratto *et al.* (2007), Conde *et al.* (2008), Gamarra *et al.* (2008), Mendoza *et al.* (2008), Machicado *et al.* (2009), Huanca *et al.* (2009), Huanca *et al.* (2010), Huamán *et al.* (2011) y Berland *et al.* (2011). y hasta la fecha no se han logrado preñeces con la aplicación de esta técnica (Ruiz y Landeo, 2014).

A lo largo de los años, se han estudiado los factores que favorecen el proceso de la maduración *in vitro* (Fukui *et al*, 1982); así mismo, se observa en las publicaciones que hasta cierto punto se tiene estandarizado los tiempos de maduración y fertilización, tal como se observa en los trabajos realizador por Ayuque *et al* (2014) en llamas y Arriaga *et al* (2014), Huanca *et al* (2014), en alpacas; observándose, que la variación de los resultados se debería en parte a los medios de cultivo; además, se tiene conocimiento que en los medios de maduración son suplementados con hormonas gonadotropicas (FSH y LH) (Fukui *et al*, 1982), las cuales provocan un aumento significativo en la cantidad de AMPc en las células de la granulosa e inducen la maduración ovocitaria, de igual manera la LH mejora las condiciones, modificando el ambiente nutricional ya que aumenta la energía disponible para el ovocito; estas cualidades de las hormonas a futuro podrían traer mejores beneficios en la maduración y por ende en la fertilización de los ovocitos.

Por lo mencionado anteriormente, el trabajo de investigación tuvo por objetivos específicos: determinar el porcentaje de maduración ovocitaria utilizando diferentes proporciones de gonadotropinas 1:5 U.I. (FSH:LH) y 2:10 U.I. (FSH:LH) asociado al medio convencional de maduración (TCM) y determinar el porcentaje de Fertilización utilizando espermatozoides procedentes del conducto deferente.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Maduración del ovocito:

2.1.1. Ovogénesis

La ovogénesis abarca procesos de diferenciación, crecimiento y maduración del gameto, durante el cual se prepara el ovocito para la fertilización y subsecuentemente desarrollo embrionario (Gilbert, 2005). La ovogénesis involucra tres fases: una fase proliferativa en que las ovogonias se dividen activamente, una fase meiótica que permite la formación de los ovocitos primarios y una tercera fase de intensa degeneración de las células germinales primordiales. Los ovocitos que sobreviven a esta fase degenerativa son detenidos en el estado de diploteno de la primera división meiótica y están rodeados por una simple capa de células de la granulosa, esta estructura recibe el nombre de folículo primordial (Peña *et al.*, 2007).

2.1.1.1. Ovogonia.

En el inicio del desarrollo embrionario aparecen las células germinales primordiales. Estas células migran hacia las gónadas y se convierten en ovogonias. Las ovogonias experimentan sucesivas mitosis y luego dan lugar a la primera división meiótica que es detenida en el estadio de profase (profase I); de este modo las ovogonias se diferencian a ovocito primario (Gilbert, 2005).

2.1.1.2. Ovocito primario

Estos se encuentran rodeados por una capa de células foliculares planas que provienen de la superficie del ovario (Gilbert, 2005).

2.1.1.3. Ovocito secundario

Este continua creciendo y aparecen espacios entre las células de la granulosa que van a ser ocupadas por liquido folicular (Palma, 2001).

2.1.1.4. Atresia folicular:

La atresia folicular es el proceso a través del cual degeneran los folículos que no fueron seleccionados por ovular (Hirshfield, 1991), y ocurre a través de muerte celular por apoptosis (Tilly, 1996). Los folículos pueden volverse atrésicos en cualquier estadio del desarrollo, aunque en la mayoría de los mamíferos la mayor eliminación ocurre entre los estadios preovulatorios (Fortune, 1994). Este es el momento cuando el crecimiento continuo es dependiente de gonadotrofinas y se ha demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que la exposición de FSH es necesaria para evitar la atresia (Tilly *et al*, 1995; Chun *et al*, 1994).

Los primeros signos de atresia folicular se manifiestan en las células de la granulosa, las cuales pierden la actividad aromatasa (Gordon y Lu, 1990), mientras que el ovocito es afectado más tardíamente (Kruip *et al.*, 1982). En folículos de más de 3 mm de diámetro, el ovocito puede mantener la capacidad de desarrollo aunque la atresia folicular

haya comenzado (Hazeleger *et al.*, 1995); más aún, ha sido propuesto que el estadio inicial de la atresia folicular sería un microambiente favorable para que el Complejo cumulus-ovocito (COC) adquiriera la capacidad de desarrollo (Hagemann *et al.*, 1999) ya que las condiciones serían similares a las encontradas en el folículo justo antes de la ovulación (Espey, 1994). Curiosamente, los COC consignos de atresia sufren una reorganización de las organelas y cambios nucleares similares a los observados durante la maduración final en los folículos dominantes (Assey *et al.*, 1994).

2.1.2. Fertilización

La fecundación se considera el proceso mediante el cual los gametos interaccionan, se unen y tras la activación oocitaria dan origen a un cigoto (Wassarman *et al.*, 2000).

2.1.3. Dinámica folicular en camélidos

En los camélidos sudamericanos el desarrollo folicular se da en tres fases o estadios descritos como crecimiento, maduración y regresión (Novoa, 1991). En el desarrollo estático o de maduración el folículo dominante inhibe el desarrollo de los folículos más pequeños (Bravo, 1990), reportándose una relación inversa entre el diámetro del folículo dominante y el número de folículos pequeños (Adams *et al.*, 1990). El desarrollo de la onda folicular en alpacas se da de manera alterna en ambos ovarios, esto se comprueba con la presencia de folículo dominante en ambos ovarios en un 85% de casos (Fernández-Baca,

1993), en donde uno de los ovarios presenta folículos de tamaño ovulatorio mientras que en el otro van creciendo otros folículos que rápidamente adquirirán el tamaño ovulatorio cuando en el anterior se vuelven atrésicos (Fernández-Baca, 1993), explicándose los largos periodos de aceptación de la hembra frente al macho. La receptividad se observa cuando el folículo tiene diámetros ≥ 6 mm (Bravo y Sumar, 1989). Pero otros indican no siempre se produce alternancia entre ambos ovarios de una oleada a otra (Vaughan *et al.*, 2004).

2.1.4. Endocrinología del desarrollo folicular:

Varios factores endocrinos también están involucrados en el proceso de crecimiento folicular ovárico y maduración ovocitaria, las principales son las gonadotropinas como, la FSH y LH. La hormona LH produce proteínas responsables en la producción de andrógenos en las células de la teca y la diferenciación final de las células de la granulosa (CG). Además de estas funciones, el pico LH que ocurre durante la ovulación produce la reanudación de las meiosis, luteinización de las CG, la expansión de las células del cumulus (CC) y la ruptura de la pared folicular. La función de la hormona FSH es esencial para la esteroidogénesis, estimula la actividad enzimática aromatasa para la diferenciación de (CG) induciendo la expresión de receptores de LH, y regula la interacción trans-zonal entre CG y el ovocito. La presencia de gonadotropinas produce la expresión o inhibición de proteínas que inducen apoptosis por acción de las CG (Demeestere *et al.*, 2005). Por otra parte, La maduración nuclear

ocurre en los folículos preovulatorios después del pico de la hormona luteinizante (LH). La presencia de células somáticas en la pared folicular es necesaria para la comunicación con el ovocito y para la respuesta a las gonadotropinas (Febres y Terán, 2008).

La LH produce cambios en la señalización molecular que ocurre dentro del ovocito y que promueve la reanudación de la meiosis. Este proceso se puede lograr por la eliminación de las sustancias que detienen la maduración o puede proveer al ovocito de sustancias que promuevan la maduración; además, en el ovocito y las células foliculares, se encuentran comunicadas por una red de uniones tipo gap junctions que permiten la transferencia de pequeñas moléculas como nutrientes y moléculas mensajeras en ambas direcciones entre las células somáticas y el ovocito. Esta comunicación se encuentra implicada en el control de la detención meiótica y la maduración del ovocito. Durante la ovulación inducida por el pico LH el número de gap junctions disminuye, al mismo tiempo que ocurre la reanudación meiótica. Por otra parte la LH y la hormona folículo estimulante (FSH) activan los receptores de membrana que producen AMPc a través de la adenilil ciclasa (Luciano *et al.*, 2004); por otra parte, las moléculas de AMPc son reguladores clave en la reanudación de la meiosis, estas tienen efecto inhibitorios y estimulatorios, ya que un aumento de los niveles de AMPc foliculares inducidos por LH produce la maduración meiótica, mientras que un aumento en los niveles de AMPc del ovocito mantiene la detención meiótica (Vanhoutte, 2009).

2.2. Maduración *in vitro*

La maduración *in vitro* de ovocitos, es una técnica que se ha venido utilizando en los últimos años, con el objetivo principal de obtener ovocitos aptos para la posterior fecundación (Herrera y Jara, 2009). El proceso de maduración del ovocito se suele dividir en maduración nuclear y citoplasmática. El ovocito maduro a nivel nuclear puede ser claramente identificado como aquél que reanuda la meiosis y alcanza el estadio de MII; mientras que la maduración citoplasmática, término que abarca una serie de acontecimientos no directamente relacionados con la progresión de la meiosis pero que van a preparar al ovocito para la fecundación (Abeydeera, 2002). En el proceso de maduración *in vivo* de los ovocitos, intervienen la hormona folículo estimulante (FSH) en el crecimiento folicular, la hormona luteinizante (LH), que induce la maduración final y la ovulación del ovocito seleccionado. Varios autores han indicado que para que el proceso de maduración se lleve a cabo debe existir un balance hormonal en el folículo (particularmente de los esteroides). En un sistema *in vitro*, este balance natural es imitado agregando las hormonas FSH, LH y estradiol 17 α al medio de maduración (TCM-199). En algunos laboratorios la adición directa de estas hormonas ha sido substituida agregando suero de vacas en celo (SVC) y licor folicular bovino (LFb). Estos componentes biológicos son suficientes para producir maduración (nuclear y citoplasmática), expansión de las células del cumulus y futuro desarrollo del cigoto (Filipiak *et al.*, 2010).

- **La hormona foliculo estimulante (FSH):** Ha demostrado inducir la maduración en ovocitos de rata (Tsafiriri y Channing, 1978), coneja (Thibault y Gerard, 1973) y vaca (Suss *et al.*, 1988).
- **La hormona luteinizante (LH):** Ha demostrado tener efectos positivos en los sistemas de maduración in-vitro, porque mejora la maduración citoplasmática del ovocito en el medio de cultivo in-vitro, provoca una mayor oxidación mitocondrial de la glucosa, en los ovocitos bovinos, lo cual favorece la maduración de los mismos (Shalgui *et al.*, 1979).
 - La combinación de FSH y LH también puede estimular la expansión del cumulo celular y la maduración de ovocitos bovinos (Suss *et al.*, 1988). Sin embargo, la adición de una, otra o ambas gonadotropinas, a los medios, llevan a cabo un efecto distinto, dependiendo del estado de maduración de las células del cumulo, ya que, según este estado, las células presentan un número mayor o menor de receptores para la LH o para la FSH y, por lo tanto, responden de distinta manera según la hormona que se emplea.

2.2.1. Obtención y transporte de los ovarios:

Los ovarios que son colectados para este tipo de procedimientos provienen de animales que han sido sacrificados para abasto público (Herrera y Jara, 2009); Se toma de hembras vacías en edad reproductiva, a dos horas post –beneficio, inmediatamente se identifican y colocan en una caja térmica (Arriaga *et al.*, 2014) que

contiene solución salina 0.9% (NaCl) + antibiótico antimicótico, a 37°C, y se transportan al laboratorio dentro de las 8 a 10 horas siguientes (Huanca *et al.*, 2014).

2.2.2. Recuperación de ovocitos:

Para la obtención de los ovocitos, se han descrito dos métodos: el método de aspiración y el método de corte (Gardon, 1999). El método de aspiración, consiste en la succión de los folículos situados en la superficie del ovario por medio de una aguja. El diámetro de la aguja utilizada es considerado importante a efectos de no dañar los ovocitos recogidos (Fry *et al.*, 1997); en alpacas se utiliza una jeringa de 10 mL con una aguja de 21 G x 1 ½ pulgadas (Gomez *et al* 2002); o con una jeringa de 10 mL esteril y aguja 18G1 ½ (Huanca *et al.*, 2014) y para luego ser colocadas en un medio de lavado mientras, El método de slicing folicular (insición de la superficie del folículo del ovario) los ovarios son fijados a una pieza hemostática curva para luego, utilizar un bisturí, seccionar longitudinal y transversalmente todos los folículos visibles de 2 a 6 mm (Gomez *et al* 2002); por otra parte, aunque la recuperación de ovocitos por disección de los folículos es más laboriosa que por aspiración, asegura la recuperación de ovocitos exclusivamente de folículos no atrésicos (Ding *et al.*, 1992); Del mismo modo, es superior la proporción de ovocitos considerados como aptos para ser cultivados *in vitro*, mediante la utilización del método de corte (Hamano *et al.*, 1993).

2.2.3. Selección de los ovocitos:

La selección de los ovocitos se realiza generalmente en base a tres criterios: el diámetro de ovocitos, el aspecto de su citoplasma y las características del cumulo que los rodea. El diámetro de los ovocitos condiciona su capacidad para madurar (Sato y Montoya, 1990). Estudios han demostrado que la calidad del complejo cúmulo ovocito (CCO) tiene una implicancia directa sobre el potencial de maduración de los ovocitos; además la calidad de los ovocitos se estima al evaluar el número de capas de células que lo rodean y la morfología del citoplasma (Seneda *et al.*, 2001). La calidad de los ovocitos se estima regularmente luego de evaluar el número de capas de células que lo rodean y la morfología del citoplasma (Seneda *et al.*, 2001); además, los ovocitos pueden ser categorizados de acuerdo al número de capas de células del cumulus y la apariencia del citoplasma. De estas categorías en general se considera que solamente los ovocitos de categorías I y II poseen un elevado potencial para desarrollarse a embriones por fertilización *in vitro* en comparación a las categorías III y IV (Lonergan *et al.*, 1991).

En un estudio realizado por Huanca *et al.*, (2007) empleo la siguiente clasificación de Sanchez *et al.*, (2003).

- Ovocitos categoría I (excelentes) presentan citoplasma oscuro uniforme combinado con 5 o más capas compactas del cumulus.

- Ovocitos categoría II (buenos) presentan citoplasma oscuro uniforme conjuntamente con una corona radiada completa pero menos de 5 capas del cumulus.
- Ovocitos categoría III (regulares) presentan una pérdida de la uniformidad del citoplasma, la corona radiada se presenta incompleta y las capas del cumulus presentes son menos compactas.
- Ovocitos categoría IV (malos) presentan citoplasma no homogéneo o francamente fragmentado y las células de la corona y del cumulus se encuentran disgregadas o ausentes en su totalidad.

En camélidos se consideraron como aptos cuando tienen 2 o más capas de células de la granulosa rodeando al ovocito y con un citoplasma de color homogéneo, siendo descartados los ovocitos con cúmulo expandido, parcial o totalmente desprovistos de células de la granulosa (Ratto *et al.*, 2005). Los ovocitos de la categoría I y II se considera aptos para la maduración (Huanca *et al.*, 2007).

2.2.4. Medios de maduración:

Para la maduración *in vitro* de los ovocitos se utilizan diferentes medios de cultivo (Ham's F-10 y Ham's F-12, Krebs Ringer Bicarbonato modificado, TCM-199, MEM, Tyrodes y Waymouth MB752/1); todos ellos, presentan en su composición una mezcla de sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, glucosa, piruvato de sodio, hipoxantina, timidina y rojo fenol como indicador, en dichos medios, los componentes varían en diferentes proporciones de sus

componentes; a pesar de la amplia variedad de ellos descrita, el más utilizado es el TCM- 199 (Gliedt *et al.*, 1996 a y b).

En un estudio realizado por Rose y Bavister, (1992) en el que comparan diferentes medios de cultivo, obtuvo como resultado que el TCM-199 o MEM permiten obtener un mayor grado de fertilización, en comparación con otros; Además, según el trabajo de revisión realizado por Brackett *et al.*, (1993) está claramente establecido, que el medio de cultivo empleado para la maduración *in vitro* de los ovocitos influye significativamente en las tasas de fertilización *in vitro*. En trabajos realizados por Ayuque *et al.*, (2014) en llamas y Arriaga *et al.*, (2014); Huanca *et al.*, (2014) en alpacas utilizaron como medio de cultivo el TCM-199.

2.2.5. Suplementación de los medios de maduración:

El medio de maduración de los ovocitos, es suplementado con suero fetal bovino (SFB), suero de vaca en celo (SVC) o albumina sérica bovina (BSA). Estos elementos, favorecen la expansión de las células del cumulus y la producción de diversos factores que promueven el reinicio de la meiosis granulosa (Lee *et al.*, 1996). Otros suplementos utilizados en diferentes concentraciones, son las hormonas FSH y LH; ellas, desempeñan un papel importante en el proceso de maduración *in vivo* y son utilizadas para la maduración *in vitro* (First *et al.*, 1987). Las gonadotrofinas provocan un aumento significativo en la cantidad de AMPc en las células de la granulosa e inducen la maduración

ovocitaria. La LH mejora las condiciones de maduración *in vitro*, modificando el ambiente nutricional ya que aumenta la energía disponible para el ovocito; adicionalmente impide los efectos inhibitorios que actúan sobre el gameto, logrando de ese modo la ruptura de la vesícula germinal. Por otro lado, la FSH induce la expansión de las células de cúmulo (De los Reyes, 1994). En el estudio realizado por Stubbings *et al.*, (1988) se determina la importancia de la adición al medio de cultivo (TCM-199) de diferentes concentraciones de hormonas FSH, LH, estrógenos y suplementos como SFB e insulina. Los resultados obtenidos, demuestran que la adición de estrógenos favorece las tasas de maduración *in vitro* en comparación al aporte de FSH, LH o insulina; Sin embargo, la adición de FSH y LH favorecen las tasas de fertilización *in vitro* (Zuelke *et al.*, 1992; Saeki *et al.*, 1994). Uno de los mecanismos por los cuales la adición de la hormona LH a los medios de cultivo, favorece la tasa de ovocitos madurados *in vitro*, es el incremento de la energía disponible para el ovocito en el medio ambiente de cultivo (Brackett *et al.*, 1993).

2.3. Fertilización *in vitro*:

La fecundación se considera el proceso mediante el cual los gametos interaccionan, se unen y tras la activación oocitaria dan origen a un cigoto (Wassarman *et al.*, 2000); la fecundación *in vitro* se ha definido como la penetración de espermatozoides con capacidad de fecundar en oocitos maduros fuera del genital femenino (Lopera, 2009). En la fecundación *in vitro* se busca imitar mediante técnicas y protocolos las condiciones y los

eventos que suceden fisiológicamente en la región ampular del oviducto, específicamente la interacción entre gametos y la formación de pronúcleos y singamia (Greve *et al.*, 1991).

2.3.1. Preparación del semen.

A. Colección espermática de los conductos deferentes:

En alpacas, con el fin de colectar espermatozoides libres de la secreción de las glándulas anexas, se desarrolló la técnica de desviación de los conductos deferentes; en el cual se intenta colectar espermatozoides directamente de su reservorio, la cola del epidídimo, sin que estos tengan contacto con las secreciones de las glándulas anexas, desviando quirúrgicamente los conductos deferentes hacia la región ventral del animal o la cara interna del muslo, formando una fistula permanente en la piel desde donde se puedan colectar continuamente sin la necesidad de tener hembra receptiva ni someter a los espermatozoides a la acción de enzimas proteolíticas que intenten licuefactar el coágulo del eyaculado para un mejor manejo espermático (Quintano, 2002; Pérez *et al.* 2006).

Pérez *et al.* (2006) demostraron que es posible recuperar repetidamente espermatozoides de los conductos deferentes desviados quirúrgicamente de alpacas y llamas macho y también facilito la evaluación del volumen, concentración, motilidad, anormalidades; por otra parte, Pérez (2014), menciona que los espermatozoides pueden ser recuperados repetidamente de los conductos deferentes desviados quirúrgicamente, obteniendo buena

calidad y cantidad de espermatozoides, que pueden ser utilizados en técnicas reproductivas modernas.

B. Lavado y separación de espermatozoides motiles y no motiles:

Al menos cinco metodologías han sido descritas para la separación de los componentes del diluyente seminal de las células espermáticas y su selección, estas son: lavado por centrifugación, swam-up, gradiente de percoll, filtración en columna con lana de vidrio y migración-sedimentación. (Avery *et al.*, 1995; Rispatron *et al.*, 1996).

C. Capacitación de los espermatozoides:

El espermatozoide requiere de un periodo entre 2 y 7 h según la especie dentro del tracto reproductor de la hembra antes de poder fertilizar (Fukui *et al.*, 1990). Durante este tiempo ocurre una serie de cambios funcionales, los cuales se conocen como “capacitación”. Este es un proceso termo dependiente y solo ocurre entre 37 y 39° (Griffin *et al.*, 1992). En mamíferos, suceden dos eventos de suma importancia durante la capacitación: 1) la remoción del plasma epididimal y seminal del espermatozoide, seguida por una alteración de la glicoproteína de la membrana plasmática; esto puede ser en el útero, oviducto, o *in vitro* por contacto con las CCO, lo que incrementa la velocidad flagelar y acelera el movimiento del espermatozoide y 2) el espermatozoide se pone en contacto íntimo con las CCO por 2-3 h, tiempo en el cual estas células alteran los componentes de la superficie espermática por medio de las glicosidasas (Dale y Elder,

1997). Durante la capacitación ocurren eventos intracelulares, dentro de los cuales se incluye el cambio en la concentración y metabolismo del calcio y/o AMPc. La reacción acrosómica parece ser más completa; pero también involucra el calcio, así como la fragmentación y pérdida del acrosoma con la liberación de varias enzimas hidrolíticas y proteasas (Glied *et al.*, 1996).

2.3.2. Medio de fertilización.

La fertilización generalmente se realiza en microgotas de HEPES, a un pH de 7.8; también se utiliza PHE (Penicilamina, hipotaurina y epinefrina) como estimulante de la motilidad espermática (Gordon y Lu, 1990).

2.3.3. Relación ovocitos/espermatozoides en el cocultivo.

La relación ovocito/espermatozoide es importante en la fertilización *in vitro*. De este modo, ha podido establecer que si el número de células espermáticas es demasiado baja en relación con el número de ovocitos, obtendremos pobres resultados de fertilización; si por el contrario, el número de células espermáticas es demasiado alto se producen fenómenos de poliespermia (Saeki *et al.*, 1995).

Independientemente del medio de fertilización utilizado, la mayor parte de los protocolos de fertilización *in vitro*, utilizan entre 0.5 y 1.5 x 10⁶ células espermáticas/ml y el cocultivo con los ovocitos madurados *in vitro*, se lleva a cabo en microgotas de 50 µl, que

contienen entre 5 y 40 ovocitos (Ling y Lu, 1990; Saeki *et al.*, 1995). Referente al número de ovocitos, Ling y Lu, (1990) emplean hasta 50 ovocito por cada microgota de 50 ml de inseminación. Sin embargo, la proporción de blastocistos obtenidos disminuye si la concentración espermática es superior a 1.6×10^6 células /ml. En un estudio realizado por Ayuque *et al* (2014), utilizaron 3×10^6 esp vivos / ml (Concentración final en la gota).

2.4. Antecedentes de maduración y fertilización *in vitro* en camelidos sudamericanos.

Ruiz y Landeo, (2014) hace mención que: El primer logro significativo fue de la maduración *in vitro* (MIV) de complejos ovocito – cúmulo (COCs) de llama logrado por Del Campo *et al.* (1992), quienes utilizaron un tiempo de 36 horas en una atmósfera de 5% de CO₂ y obtuvieron 62% de ovocitos que alcanzaron el estado de metafase II. Sin embargo, en otro experimento Del Campo *et al.* (1994) obtuvieron 30% de ovocitos en metafase II luego de 30 horas de MIV. En ambos experimentos se utilizaron distintos protocolos de recuperación de COCs lo que explicaría los diferentes resultados. En el primer caso se aspiraron los folículos ováricos con ayuda de una jeringa mientras que en el segundo los ovarios fueron recuperados con ayuda de una hoja de afeitar recuperando una población muy heterogénea de ovocitos desde folículos preantrales y antrales en todos los estados de desarrollo (Hyttel *et al.* 1997).

La primera especie con la que se trabajó en MIV y FIV fue la llama (Del Campo *et al.* 1992, Del Campo *et al.* 1994, Ratto *et al.* 1999, Ratto *et al.*

2005, Conde *et al.* 2006, Conde *et al.* 2008); estableciéndose como 28 horas el tiempo óptimo de maduración *in vitro* (Ratto *et al.* 2005). Sin embargo, también se ha logrado madurar *in vitro* con éxito COCs de vicuña y alpaca.

Huanca *et al.* (2009) recomiendan 38 horas o más para la MIV de COCs de alpaca, debido a que encontraron 18.9%, 42.9% y 65.8% de COCs en Metafase II para 30, 34 y 38 horas de maduración respectivamente y tasas de segmentación de 9.5%, 7.7% y 15.4% para 30, 34 y 38 horas de maduración respectivamente, no reportan el logro de blastocistos. Por otro lado Santayana (2012) encontró que el mayor porcentaje de maduración nuclear (ovocitos en MII) fue alcanzado a las 32 h de cultivo *in vitro* con un 65.1%, seguido por el de 28 h con un 50.3% y finalmente el de 24 h con un 46.3%. En cuanto al desarrollo embrionario, observó que los porcentajes de segmentación y blastocistos aumentaron gradualmente hacia el mayor tiempo de maduración, siendo el de 32 h el tiempo con el mayor índice de desarrollo alcanzado, con un 60.2% y 17.0% en comparación con 47.5% y 14.2% para 28 h y 41.6% y 11.0% para 24 h, para los estadios de segmentación y blastocito respectivamente, resultados que no son contrarios a lo indicado por Huanca *et al.* (2009). Por otro lado Gamarra *et al.* (2008) utilizaron 30 horas para la MIV de COCs de alpaca y obtuvieron 27.1% de segmentación y 8% de blastocistos utilizando espermatozoides epididimarios congelados.

Para FIV en llamas, Del Campo *et al.* (1994) separaron epidídimos de testículos y obtuvieron espermatozoides de llama por centrifugación en gradiente de Percoll, los cuales fueron utilizados para fecundar ovocitos madurados *in vitro* logrando por primera vez el desarrollo de embriones producidos por FIV. En este trabajo recolectaron 1324 COCs de 98 ovarios de llamas beneficiadas, permitiéndoles disponer de gran cantidad de ovocitos para realizar diferentes tratamientos para la FIV, fijar ovocitos para evaluar el estado de maduración nuclear y describir el desarrollo embrionario producido después de la FIV. 234 ovocitos inseminados fueron co-cultivados con células epiteliales de oviducto de llama (LLOEC) previamente preparadas, 32% dividieron (embriones de 2 células) a las 48 horas de evaluación y a los 9 días de evaluación 15.8% detuvo su desarrollo entre 2-16 células, 5.6% desarrollaron hasta mórula, 6.0% entre blastocitos tempranos y expandidos y 4.7% de blastocitos eclosionados.

Ruiz y Correa (2007) maduraron ovocitos de alpaca y llama durante 27 y 30 horas, respectivamente en TCM-199 suplementado con piruvato de Na (0,2 mM), sulfato de gentamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), FSH (0,02 unidades/ml), estradiol ($17\text{-}\beta$ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y suero fetal bovino al 10%, obtuvieron 75% y 100% de ovocitos en Metafase II de llama y alpaca. Sansinema *et al.* (2007) utilizó un medio para la MIV consistente de TCM-199, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FSH, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LH, 10 ng/mL de EGF, 10 ng/mL de IGF-1 y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estradiol 17b y 10% de suero fetal bovino, obtuvo un 74% de ovocitos en Metafase II luego de 30 horas de maduración *in vitro*.

En un trabajo de investigación realizado en llamas por Ayuque *et al* (2014), utilizó para la maduración *in vitro* el medio TCM-199 suplementado con suero fetal bovino al 10% y 0.02 unidades/mL de FSH; obtuvo: 71% a la maduración *in vitro* en un tiempo de 36h; para la fertilización, recuperaron espermatozoides epididimarios de testículos de provenientes del camal, obteniendo una fertilización de 51.51% en segmentación y 11.76% de blastocisto. Por otra parte, en trabajo mencionado por el mencionado autor, cita a Ratto *et al* (2005) quien trabajo en llamas y encontró 80.4% (36h) en la maduración.

Arriaga *et al* (2014) para la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca, utilizo el medio de maduración TCM-199 y suplementado con FSH a 16h y una temperatura de 12-15°C y 22-25°C; obtuvo, 12.2% (6/49) en (12-15°C) y 32.69%(17/52) en (22-25°C); además, para el ensayo de la fertilización, obtuvo espermatozoides de la cola de epidídimo, provenientes de testículos de camal, obteniendo 14% (21/148) en (12-15°C) y 20.60% (41/190) en (22-25°C) de ovocitos fertilizados.

Huanca *et al* (2014) trabajo con TCM-199 suplementado con suero fetal bovino al 10% y FSH al 0.5ug/ml en la maduración de ovocitos de alpacas; obteniendo, 98%(136/138) en 34h y 95% (119/125) en 38h; además a la fertilización tuvo como resultados de 8.2% (10/122) y 15.8% (22/139), utilizando espermatozoides provenientes de epidídimos de machos beneficiados en el camal; por otra parte, Huanca *et al* (2009) obtuvo en la maduración 42.9% (34h) y 65.8% (38h), para la fertilización 7.7% y 15.4%.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, situado en el Distrito, Provincia, y Región de Puno – Perú a 3,824 m.s.n.m. con 15°49'20.4" Sur y 70°01'07.3" Oeste. (SENAMHI, 2012).

3.2. Material de estudio

Para el estudio se aspiraron 590 folículos de ovarios de alpacas beneficiadas en el camal de Ayaviri provincia de Melgar del departamento de Puno, del total seleccionándose 249 ovocitos (categoría I) para la maduración *in vitro*.

Tabla 1: Distribución de los ovocitos en los tratamientos

N° DE OVOCITOS TOTAL	TRATAMIENTO 1 1UI de eCG+5 UI de hCG/mL	TRATAMIENTO 2 2UI de eCG+10 UI de hCG/MI
249	125	124

Autor: Elaboración propia.

3.3. Metodología:

A. Obtención de los ovarios

Los ovarios se obtuvieron de alpacas beneficiadas en el Camal de la Municipalidad de Ayaviri, una vez colectadas fueron inmersas en el

medio de transporte Solución Fisiológica más antibiótico (100 UI de Penicilina y 1 mg Estreptomicina / mL) dentro de bolsas de polietileno los cuales se introdujeron en baño maría (termo de 2L) a una temperatura de 35 – 37 °C.

B. Aspiración de los ovocitos

- Una vez en el Laboratorio, los ovarios fueron lavados tres veces con Solución Fisiológica separando restos de tejidos, realizándose un estricto control de la temperatura durante todo el proceso (37°C).
- La obtención de ovocitos se realizó mediante la técnica de aspiración de los folículos mayores de 2 mm con ayuda de una jeringa de 5 mL y una aguja 21 G x 1 ½ a una presión de 15 – 20 mL por minuto.
- El líquido folicular aspirado fue depositado en tubos de ensayo de 15 mL de capacidad que estuvieron sumergidos en baño maría (37°C.)

C. Selección de los ovocitos

- La localización de los ovocitos fue con ayuda de un microscopio estereoscópico a 20X.
- El recojo de los ovocitos se realizó con un Tip de 10µL adosada a una jeringa de 1mL.
- Los ovocitos seleccionados se introdujeron a otra placa contenía 3 mL de medio (PBS + 1% de suero fetal).
- Se seleccionaron los ovocitos de categoría I y II tomando los siguientes criterios:

- Todos los ovocitos considerados aptos para la maduración *in vitro* deberán poseer un citoplasma granulado, uniforme, el cual debe llenar completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida.
- Las células del cumulus oophorus que rodea al ovocito debe presentarse en capas celulares uniformes y compactas, no deben estar expandidas ni dispersas, tampoco pueden presentar aglutinaciones celulares, deben permitir la distinción del ovocito y la zona pelúcida.

D. La colección de los espermatozoides:

La colección de espermatozoides se realizó de los conductos deferentes de 2 machos, con ayuda de un tips de micropipeta adosado a una jeringa. Las microgotas de controla a 1mL de sperm-talp (37°) y se transporta al lavatorio.

1. El tubo de ensayo con los espermatozoides que se colectó homogenizado con el sperm-talp se realizó el “swim” up dentro de baño maría a 38.6 °C por 25 minutos, el tubo se selló con una tapa de goma al cual se le adiciono 0.6 ml de CO₂ con ayuda de una jeringa de tuberculina.
2. Del sobrenadante se aspiró aproximadamente 700 uL de muestra.
3. En otro tubo de ensayo estos 700 uL se centrifugo a 1600 rpm/10min.

4. El sobrenadante se eliminó y al pelt espermático se le adicionó 700uL de fertalp, se colocó al baño maría a una T° de 38.5 °C hasta su uso en la fertilización.

E. Maduración de los ovocitos

- Los ovocitos seleccionados fueron distribuidos en número de 15 ovocitos por microgotas de 50 uL de medio de maduración.
- El medio de maduración estuvo constituido por: TCM-199 + bicarbonato + piruvato + 10% de SFB (FSH: LH) (anexo 7).
 - a. Para el tratamiento 1 al medio de maduración se suplemento 1UI de eCG+5 UI de hCG/mL.
 - b. En el tratamiento 2 al medio de maduración se suplemento 2UI de eCG+10 UI de hCG/mL.
 - c. El medio de maduración se preparó colocando 50 uL en una placa petri de 10 x 35 mm cubiertas con aceite mineral.
- La placa petri y el medio de maduración se colocaron dentro de la incubadora de CO₂ por 2 h. antes, con la finalidad de equilibrarlo.
- Seguidamente se introdujeron en el medio de maduración los ovocitos seleccionados en las placas petri a una temperatura de 38.5°C, 5% de CO₂ y 100% de humedad, durante un periodo de 36 h.

F. Evaluación de la maduración de los ovocitos

Finalizado el periodo de maduración, los ovocitos madurados, se colocaron en gotas bajo la lupa del microscopio estereoscópico a 50x y se evaluó la maduración tomando en cuenta los siguientes criterios;

1. Proporción de expansión de las células del cúmulus
2. Grado de elasticidad.
3. Presencia de corpúsculo polar (previamente desnudado el ovocito maduro).
4. Presencia de espacio peri-vitelino.

G. Fertilización *in vitro*:

- Se prepararon 50 uL de medio de fertilización fet talp (anexo 8) dentro de una placa Petri de 10 x 35 mm cubierto por aceite mineral y se colocó dentro de la incubadora para su equilibración por 2h aproximadamente.
- La colección de espermatozoides se realizó de los conductos deferentes de dos alpacas machos, con ayuda de un tips de micropipeta adosado a una jeringa de 1mL-
- Las microgotas de espermatozoides se introdujeron a 1 mL de sperm-talp (37°C) y se transportó al laboratorio.
- El tubo de ensayo con los espermatozoides y sperm-talp se realizó el swim up dentro de baño maria a 38.5 °C por 25 minutos, el tubo de ensayo se selló con una tapa de goma al cual se le adicionó 0.6 ml de CO₂ con ayuda de una jeringa de tuberculina.

- Del sobrenadante se aspiró aproximadamente 700 μ L de muestra de espermatozoides.
- En otro tubo estos 700 μ L se centrifugó a 1600 rpm por un lapso de 10 minutos.
- El sobrenadante se eliminó y a los espermatozoides restantes se le adicionó 700 μ L de Fert Talp se colocó en baño maría a una temperatura de 38.5°C hasta su uso en la fertilización.
- Después de realizado esta acción se adicionó la concentración de 2×10^6 espermatozoides lavados.
- Los ovocitos maduros se lavaron 2 ó 3 veces en gotas de fert-talp y posteriormente se introdujeron la gota de fertilización (placa equilibrada).
- Además se adicionó (10 μ g/mL) y μ L de PHE/ 2mM de penicilamina, 1 mM Hipotaurina y 250 mM de epinefrina).
- Cada placa se colocó dentro la incubadora y se dejó reposar por 5 minutos.
- Todo ello se colocó en cada gota de medio de fecundación con 15 ovocitos, el co-cultivo fue realizado por 18 horas a 38.5°C, 5% de CO₂ y bajo condiciones de máxima humedad.

H. Evaluación de la fertilización:

- A las 18 horas post. Fertilización los presuntos cigotos se vortexizaron en PBS + 10% de SFB a 10 rpm por 5 s.

- El medio vortezizado se vertió en una placa Petri de 10 x 35 mm y se lavó adicionando el tubo con PBS con ayuda de una jeringa 21 G x 1 ½ a una presión de 15 – 20 mL/min.
- Los cigotos encubados fueron evaluados con ayuda de un microscopio estereoscópico a 200X y tomando en cuenta lo siguiente: presencia del segundo corpúsculo polar, presencia del espermatozoide dentro del espacio perivitelino, presencia de pronúcleo y presencia de blastómeros.

3.4. Prueba estadística

Para ver las proporciones de maduración y fertilización se aplicó la prueba estadística de Ji-cuadrada

$$x^2 = \sum_{i=1}^k \sum_{i=1}^k = \frac{(O_i + E_i)^2}{E_i}$$

a. Maduración de ovocitos:

X^2 = población observable de ovocitos

O_i = ovocitos maduros observados

E_j = ovocitos maduros esperados

b. Fertilización de ovocitos:

X^2 = población de ovocitos fertilizados

O_i = ovocitos fertilizados observados

E_j = ovocitos fertilizados esperados

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de las gonadotropinas (FSH y LH) sobre la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca.

La tabla 2 muestra los resultados de la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca, donde se observa los siguientes resultados: Con la concentración 1:5 UI (FSH:LH) se obtuvo un 71.2% (89/125) de ovocitos, presentando corpúsculo polar (29) y espacio perivitelino (60) los cuales son considerados como maduros de un total de 89 ovocitos; Así mismo, con la concentración 2:10 UI (FSH:LH) se tuvo un 74.2% (92/124) de ovocitos, presentando 26 corpúsculos polares y 66 espacios perivitelinos en los ovocitos. Los resultados obtenidos fueron sometidos a la prueba de Ji-cuadrada, observándose que no hay significancia estadística ($p > 0.05$); sin embargo se observa que a una mayor concentración de FSH y LH hay mayor porcentaje de maduración.

Tabla 2: Maduración in vitro de ovocitos de alpaca expuestas a diferentes concentraciones de FSH y LH.

Tratamiento	N° ovocitos	MADURO	NO MADURO
1FSH:5LH	125	71.2% 89/125	28.8% 36/125
2FSH:10LH	124	74.2% 92/124	25.8% 32/124
TOTAL	249	72.7% 181/249	27.3% 68/249

Trat.=tratamiento; FSH=Hormona foliculo Estimulante; LH= Hormona luteinizante; N°-O=Numero de ovocitos; CP=Corpúsculo polar; EP=Espacio perivitelino; ($p > 0.05$).

Los resultados mostrados en la tabla 2 del estudio comparados con Huanca *et al.* (2014) son inferiores, quien obtuvo una maduración *in vitro* de

ovocitos de alpaca, obteniendo 98% (136/138) en 34 h. y 95% (119/125) en 38h, donde utilizaron como medio de suplementación 0.5 ug/mL de FSH suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), 0.5 µg/mL de FSH, 10 µg/mL de hCG, 0.2 mM de piruvato de sodio, 50 µg/mL de gentamicina y 1 µg/mL de E2, y cultivados a 39 °C bajo una atmósfera de 5% de CO₂ y alta humedad; Además Ruiz y Correa (2007) maduraron ovocitos de alpaca y llama durante 27 y 30 horas, respectivamente en TCM-199 suplementado con piruvato de Na (0,2 mM), sulfato de gentamicina (50 µg/mL), FSH (0,02 unidades/ml), estradiol (17-β 1µg/mL) y suero fetal bovino al 10%, obtuvieron 75% y 100% de ovocitos en Metafase II de llama y alpaca, respectivamente. Sansinema et al. (2007) utilizó un medio para la MIV consistente de TCM-199, 5 µg/mL de FSH, 10 µg/mL de LH, 10 ng/mL de EGF, 10 ng/mL de IGF-1 y 1µg/ml de estradiol 17b y 10% de suero fetal bovino, obtuvo un 74% de ovocitos en Metafase II luego de 30 horas de maduración *in vitro*; así mismo, los datos encontrados fueron similares a los obtenidos por Ayuque et al. (2014), obtuvo una maduración nuclear de cultivo *in vitro* entre 36 y 42 horas (70.17±4.21% y 70.53±3.72%), respectivamente usando un medio de maduración TCM-199 suplementado con HEPES 25mM, piruvato de sodio 0.2 mM, sulfato de gentamicina 50 ug/mL, FSH 0.02 UI/mL Estradiol17-B 1 ug/mL y suero fetal bovino al 10%, e incubados a 38.5°C en una atmósfera de aire estéril con 5% CO₂. 5% H₂O, 90% N₂, por otro lado Miragaya et al (2002) obtuvo un 62% estudio la maduración *In Vitro* de ovocitos, obtenidos por aspiración quirúrgica a las 22 horas después de la administración de un análogo de GnRH, en llamas estimuladas con un progestágeno y estimuladas con 500 UI de eCG.

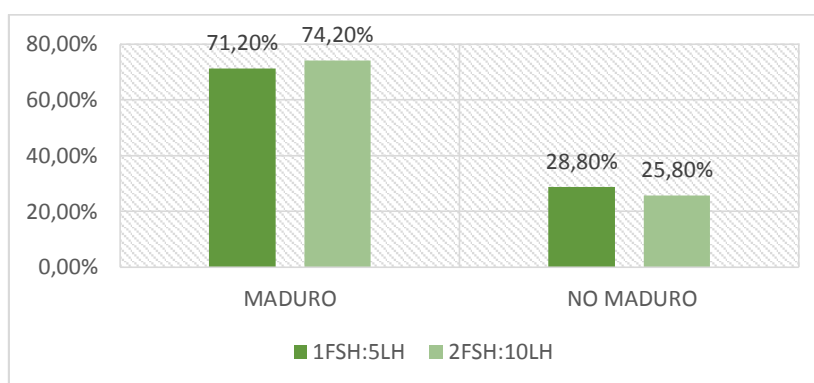


Figura 1: Porcentaje de maduración de ovocitos de alpaca con dos concentraciones de gonadotropinas 1:5 UI y 2:10 UI (FSH: LH)

4.2. Efecto de los espermatozoides procedentes del conducto deferente sobre la fertilización *in vitro* en ovocitos de alpaca.

La tabla 3 muestra los resultados de la fertilización *in vitro* de ovocitos madurados *in vitro* y fertilizados con espermatozoides del conducto deferente, donde se observa los siguientes resultados: ovocitos madurados con la concentración 1:5 UI (FSH:LH) fueron fertilizados en 60.7% (54/89), presentando 23 ovocitos el segundo corpúsculo polar y 31 ovocitos con presencia de blastocistos, los cuales son considerados como fertilizados en un total de 54%. Los ovocitos que fueron madurados con la concentración de 2:10 UI (FSH: LH), se obtuvo un 64.1% (59/92) presentando 26 ovocitos con segundo corpúsculo polar y 33 ovocitos con presencia de blastocistos. Los resultados obtenidos fueron sometidos a Ji-cuadrada, mostrando no hay significancia estadística ($p > 0.05$). Sin embargo, los ovocitos que fueron madurados *in vitro* con mayor concentración de FSH y LH fueron fertilizados en mayor porcentaje.

Tabla 3: Porcentaje de fertilización de ovocitos madurados con 1:5 UI (FSH) y 2:10 UI (FSH: LH) con espermatozoides procedentes del conducto deferente (2x¹⁰esp.)

Tratamiento	Nº ovocitos	Fertilizaron		No fertilizaron	
1FSH:5LH	89	60.7%	54/89	38.3%	35/89
2FSH:10LH	92	64.1%	59/92	35.9%	33/92
TOTAL	181	62.4%	113/181	37.6%	68/181

Trat.=tratamiento; FSH=Hormona folículo Estimulante; LH= Hormona luteinizante; N°-O=Numero de ovocitos; 2° CP=Corpúsculo polar; BL=blastocitos; (p>0.05).

Los resultados fueron superiores a lo reportado por Ayuque *et al* (2014), quien realizó fertilización en llamas y obtuvo 51.51% en segmentación y 11.76% de blastocitos, utilizando espermatozoides de epidídimo de testículos provenientes del camal; así mismo, Arriaga *et al.* (2014) obtuvo una fertilización de 14% (21/148) en (12-15°C) y 20.60% (41/190) en (22-25°C) de ovocitos de alpaca, trabajando con espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo, de testículos obtenidos del camal; de igual manera, a lo mencionado por Huanca *et al.* (2014) quien reporta una fertilización de 8.2% (10/122) y 15.8% (22/139) en segmentación y blastocitos respectivamente con espermatozoides provenientes de epidídimos de machos beneficiados en el camal por otro lado Ayuque *et al.* (2014) determinaron el tiempo óptimo de maduración nuclear de ovocitos en el desarrollo de embriones producidos por FIV, para ello MIV ovocitos de llama por espacio de 28, 36 y 42 horas. Los resultados obtenidos muestran que el mayor porcentaje de ovocitos en metafase II está entre 36 y 42 horas con 70,2% y 70,5 respectivamente, seguido de 28 horas con 49,1%. En

cuanto a los resultados del desarrollo embrionario, obtuvieron porcentajes de segmentación, mórula y blastocistos de 51.0%, 71.5% y 11.6%, respectivamente en 36 horas y los porcentajes de segmentación, mórula y blastocistos de 49.6%, 76.7% y 12.5% respectivamente en 42 horas.

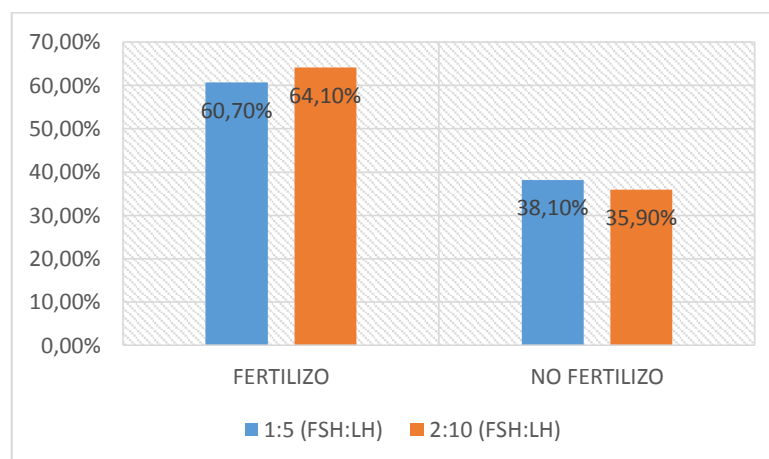


Figura 2: Porcentaje de fertilización de ovocitos madurados 1:5 y 2:10 (FSH:LH) y fertilizados con espermatozoides provenientes del epididmo.

Pérez *et al.* (2006) demostró que es posible recuperar repetidamente espermatozoides de conductos deferentes desviados quirúrgicamente de alpacas y llamas macho, además, de su evaluación; de igual forma, Pérez *et al.* (2014) hace mención que los espermatozoides recuperados repetidamente de los conductos deferentes desviados quirúrgicamente, son de buena calidad y cantidad de espermatozoides y que pueden ser utilizados en técnicas reproductivas; ello se observa, en nuestros resultados obtenidos, donde se ve el mayor porcentaje de ovocitos fertilizados utilizando espermatozoides procedentes del conducto deferente frente a los trabajos realizados por: Ayuque *et al.*, (2014) en llamas, Arriaga *et al.*, (2014) y Huanca *et al.*, (2014) en alpacas, quienes trabajaron con espermatozoides provenientes de testículos obtenidos en los camales

Municipales; esto posiblemente se deba a el factor de maduración y desarrollo de los espermatozoides durante su trayecto. Esta calidad de espermatozoides obtenidos del conducto deferente más los ovocitos de buena calidad obtenidos a través de la maduración *in vitro* brinda como resultados un mayor porcentaje de fertilización

La superioridad de la fertilización obtenida en el trabajo puede deberse a la viabilidad de los ovocitos obtenidos y que fueron madurados en medio TCM-199 y suplementados con FSH y LH, ya que ambas activan los receptores de membrana que producen AMPc a través de la adenilatociclasa (Luciano *et al.*, 2004). Las moléculas de AMPc son reguladores clave en la reanudación de la meiosis.

V. CONCLUSIONES

- La adición de gonadotropinas (FSH y LH) como suplemento al medio TCM-199 favorece la maduración de ovocitos de alpacas, alcanzando un porcentaje de 71.2 % y 74.2 % para las concentraciones de 1:5 UI y 2:10 UI, respectivamente.
- La utilización de espermatozoides procedentes del conducto deferente favorece la fertilización de ovocitos madurados con 1:5 UI y 2:10 UI (FSH:LH) de concentración, alcanzando un 60.7 % y 64.1%, respectivamente.

VI. RECOMENDACIONES

- Comparar concentraciones mayores de gonadotropinas (FSH y LH) al estudio realizado.
- Utilizar la hormona estradiol conjuntamente con la FSH y LH en medios de maduración.
- Comparar distintas concentraciones de espermatozoides procedentes del conducto deferente para la fertilización *in vitro*.
- Tener cuidado al momento de la recuperación de los ovocitos con respecto a los tiempos y la temperatura

VII. REFERENCIAS

- Abeydeera, L. R. 2002. In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology*; 57: 257-273.
- Adams, G., J. Sumar and O. Ginther. 1990. Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *J. Reprod. Fert.* 90, 535-45.
- Arriaga, I., W. Huanca, M. Terreros, J. Becerra, P. Garcia, y A. Ampuero. 2014. Efecto de temperatura y tiempo de almacenamiento de ovarios de Alpacas sobre la tasa de maduración y división in vitro de ovocitos. *Inv Vet Perú* 2014; 25(4) 477-486.
- Assey, R., P. Hyttel, T. Greve, and B. Purwantara. 1994. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol Reprod Dev* 37:335-344.
- Ayuque, A., E. Justiniano, J. Mendoza, L. Landeo, y J. Ruiz. 2014. Efecto del tiempo de maduración in vitro en la capacidad meiotica y desarrollo de embriones de llama. *Spernova*. 201; 4(1). 99 – 101.
- Avery, B., and T. Greve. 1995. Impac of percolla on bovine spermatozoa used fo in vitro insemination. *Theriogenology*. Vol. 44:pp871-878.
- Berland, M., A. Von Baer, J. Ruiz, V. Parraguez, and M. Ratto. 2011. *In vitro* fertilization and development of cumulus oocytes complexes collected by ultrasound-guided follicle aspiration in superstimulated llamas. *Theriogenology* 75, 1482-1488.
- Brackett, B. G., and K. A. Zuelke. 1993. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*. Vol. 39, pp. 43-64.
- Bravo, W. and J. Sumar. 1989. Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. *Anim. Reprod. Sci.* 30, 271-281.

- Bravo, W. 1990. Studies on ovarian dynamics and response to copulation en the South American camelids *Lama glama* and *Lama pacos*. Thesis Ph.D university of California, Davis U.S.A.
- Conde, P. A., C. Herrera, V. L. Trasorras, S. Giuliano, A. Director, M. H. Miragaya, M. G. Chaves, M. I. Carchi, D. Stivale, C. Quintans, C. A. Agüero, B. Rutter, and S. Pasqualini. 2008. *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Animal Reproduction Science*. 109, 298 - 308.
- Conde, P., C. Herrera, M.G. Chaves, S.M. Giuliano, A director, VL Trasorras, M. Pinto, M.I. Carchi, D. Stivale, B. Rutter, A. Agüero, M.H. Miragaya, and R.S. Pasqualini. 2006. *In vitro* production of llama embryos by IVF or ICSI. *Reproduction, Fertility and Development* 19 (1) pages 237-238.
- Chun, S., H. Billig, J. L. Tilly, I. Furuta, A. Tsafiriri, and A. Hsueh .1994. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: Mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 135:1845-1853.
- Dale, B. and K. Elder 1997. *In vitro* fertilización. Cambridge University Press; p 187.
- Del Campo, M., C. H. Del Campo, G. Adams and R. Mapletoftt. 1995. The application of new reproductive technologies to South American Camelids. *Theriogenology* 43: 21-30.
- Del Campo, M., C. Del Campo, M. Donosos, M. Berland, and R. Mapletoft. 1994. *In vitro* fertilization and development of *Lama glama* oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology* 41: 1219-1229.

- Del Campo, M., M. Donoso, and C.H. Del Campo. 1992. *In vitro* maturation of Llama (*Lama glama*) oocytes. *Proc 12th Int Cong Anim Reprod.* 1992; vol 1, p 324.
- De los Reyes, M. 1994. Fecundación in vitro en bovinos: Avances en el manejo de gametos. *Avances de Medicina Veterinaria*, Vol.9, N°1, Enero-Junio, 1994.
- Demeesteres, I., J. Centner, C. Gervi , Y. Englert y delbaere. 2005. Impact of various endocrine and paracrine factor on in vitro culture of preantral follicles in rodents society for reproduction and fertility.
- Ding, J., N. Clarke, T. Nagai, y R.M. Moor. 1992. Protein and nuclear changes in pig eggs at fertilization. *Mol Reprod Dev* . 31: 287-296.
- Espey, L. 1994. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod* 50:233-238.
- Febres, F. y C. Terán. 2008. Ovogénesis, foliculogénesis, síntesis de esteroides ováricos y reserva folicular. En Lerner J. Urbina MT. *Fertilidad y reproducción asistida*. 1° edición Venezuela: Editorial medica Panamericana. 552-558.
- Fernández-Baca, S. 1993. Manipulation of reproductive functions in male and female new world camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 33, 307-323.
- Filipiak, Y. y C. Larocca .2010. Fertilización in vitro en bovinos. Manual teorico-practico. Area de biotecnología de la eproduccion Animal. Facultad de Medicina veterinaria. Universidad de la republica Montevideo, República Oriental del Uruguay.
- First, N. L., and J. Parrish. 1987. In vitro fertilization of ruminants. *J. Reprod. Fertil.* Vol. 34 (suppl), pp. 151-165.

- Fortune, J.E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 50:225-232.
- Fry, R. C., E. M. Niall, T. L. Simpson, T. J. Squires, and J. Reynolds. 1997. The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*. Vol. 47, pp. 977-987.
- Fukui, Y., M. Fukushima, Y. Terawaki, and H. Ono. 1982. Effect of gonadotropin, steroids and culture media on bovine oocyte maturation. *Theriogenology* 18: 161-175.
- Fukui, Y. 1990. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Mol. Rep. Dev.* Vol. 26, pp. 40-46.
- Gamarra, G., E Huamán, S. León, M. Carpio, E. Alvarado, M. Asparrin, and W. Vivanco. 2008. First in vitro embryo production in alpacas (*Lama pacos*). *Reproduction, Fertility and Development* 21,177-178.
- Gardón, M. 1999. Utilización de antisuero H-Y para sexar embriones bovinos en diferentes estadios del desarrollo embrionario, obtenidos por fertilización in vitro. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.
- Gilbert. 2005. *Biología del desarrollo*. Editorial Médica Panamericana. 7° edición Buenos Aires, Argentina 670-673.
- Glied, D.W., C.F. Rosenkrans, R.W. Rorie and J.M. Rakes. 1996. Effects of oocyte maturation length, sperm capacitation time, and heparin on bovine embryo development. *Journal of Dairy Science* Vol 79(4).
- Gigli, I., A. Russ y A. Agüero. 2006. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equinos, bovinos y camélidos sudamericanos. Artículo de revisión. ISSN (on line) 1668-3498.

- Greve, T., and V. Madison. 1991. In vitro fertilization in cattle: a review. *Reprod Nutr Dev.*; 31(2): 147-157.
- Griffin, E.J., and R.S. Ojeda. 1992. *Textbook of endocrine physiology and edition* Oxford University Press. New York, Oxford, pp 351.
- Gómez, C., M. H. Ratto, M. Berland, M. Wolter, and G.P. Adams. 2002. Superstimulatory response and oocyte collection in alpacas. *Theriogenology* 57:584 (abstract).
- Gordon, I. y K.H. Lu. 1990. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology* 33:77-87.
- Hamano, S., and M. kuwayama. 1993. In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*. Vol. 39, pp. 703-712.
- Hagemann, L.J., S.E. Beaumont, M. Berg, M.J. Donnison, A. Ledgard, A.J. Peterson, A. Schurmann, and H.R. Tervit .1999. Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: Interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol Reprod Dev* 53:451- 458.
- Herrera, L. y O. Jara. 2009. Comparación de dos suplementos para maduración de ovocitos ovinos in vitro. Tesis. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de la Valle. Bogota.
- Hirshfield, A.N. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124:43-101.
- Hyttel, P., T. Fair, H. Callesen, and T. Greve. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47:23-32.

- Huamán, E., F. Ticllacuri, L. Landeo y Ruiz J. 2011. Efecto de la atmósfera de cultivo sobre el desarrollo de embriones de alpacas producidos por fecundación in vitro. XXXIV Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Trujillo – Perú.
- Huanca, W., J. Palomino, M. Cervantes, A. Cordero y T. Huanca. 2007. Efecto de temperatura de transporte (35° y 4°C) sobre la calidad morfológica de ovocitos colectados desde ovarios de camal. Procc. XX Reunión ALPA y XXX Reunión APPA- Cusco, Perú.
- Huanca W, R. Condori, J. Cainzos, M. Chileno, L. Quintela, J. Becerra, and P.G. Herradon. 2009. In vitro maturation and in vitro fertilization of alpaca (*Vicugna pacos*) oocytes: effect of time of incubation on nuclear maturation and cleavage. *Reproduction, Fertility and Development* 2009; 22(1): 327–327. Reunión Científica Anual - APPA. Trujillo - Perú. pp. 135-39.
- Huanca, W., R. Condori, M. Chileno, J. Cainzos, J. Becerra, L. Quintela, and P.G. Herradon. 2010. In vivo maturation and in vitro fertilization of alpaca oocytes. *Reproduction, Fertility and Development* 23(1) 204-205.
- Huanca, W. 2012. Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos como alternativas para la mejora genética VI Congreso Internacional de Ganadería de Doble Propósito – XVI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal.
- Huanca, W., R. Condori, M. Chileno, P. Garcia, J. Cainzo, y J. Becerra. 2014. Evaluación de cuatro tiempos de cultivo sobre la tasa de maduración y división postfecundación in viro de ovocitos de alpaca *Rev Inv Vet Perú* 2014; 25 (4): 468 – 476.

- INEI. 2012. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Resultados. Definitivos. IV Censo Nacional Agropecuario. Ministerio de Agricultura. Lima-Perú.
- Kruij, T.A., and S.J. Dieleman. 1982. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reprod Nutr Dev* 22:465-473.
- Lee, E. S., Y. Fujii, and Y. Fukui. 1996. A comparative study on developmental capacity to blastocysts derived from 1- and 2(3)-cell bovine embryos after in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology*. Vol. 45(6), pp.1151-1162.
- Ling, Z. J. and K. H. Lu. 1990. Frequency of cleavage and development of in vitro bovine oocytes fertilized in different numbers in drops with different sperm concentrations. *Theriogenology*. Vol. 33, pp. 275.
- Lonergan, P., E. Vergos, A. Kinis, H. Sharif, and I.Gordon. 1994. The effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for IVM. *Theriogenology* 35:231.
- Lopera, R. 2009. Estudio de factores que influyen en la fecundación in vitro heteróloga entre espermatozoides de caprino y oocitos de bovino madurados in vitro. Tesis de master. Master Interuniversitaria en mejora genética animal y biotecnología de la reproducción. Universidad Politécnica de Valencia.
- Luciano, A., S. Modina, R. Vassena, E. Milanesi, A. Lauria, and F. Gandolfi 2004. Role of intracellular cyclic adenosine 3', 5' monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the

developmental competence during in vitro maturation of bovine oocyte biology of reproduction.

- Machicado, R., P.A. Delgado, y Flores. 2009. Descripción del proceso de fertilización in vitro de ovocitos de llama (*Lama glama*) obtenidos por superestimulación ovárica con eCG y fertilizados con semen tratado con proteasa. V Congreso Mundial sobre Camélidos. Riobamba. Ecuador.
- Mendoza, J., A. Ayuque, F. Triviño, G. Ayuque, L. Landeo, y J. Ruiz. 2008. Evaluación de dos métodos de recuperación de espermatozoides epididimarios para la fecundación in vitro de ovocitos de alpaca. XXXI Reunión Científica de la Asociación Peruana de Producción Animal. Lima – Perú.
- Miragaya, M., M.G. Chaves, Capdevielle EF, M.S. Ferrer, M.R. Pinto, B. Rutter, and D.M. Neild. 2002. In Vitro maturation of llama (*Lama glama*) oocytes obtained surgically using follicle aspiration. *Theriogenology* 57 (1), 731.
- Novoa, C. 1991. Fisiología de la reproducción de la hembra; In: Fernández-Baca S. editor. *Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos*. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago de Chile.
- Palma, G. 2001. *Biología reproductiva*. Ediciones Instituto nacional de Tecnología Agropecuaria. 1° edición Argentina 362 – 364.
- Peña, J.M., O.A. Gongora, and L.J. Estrada. 2007. Growth factor in the follicular development, embryonic early and implantation implication in the production of bovine embryos. *Rev mvz, Córdoba* Jan/June 2007, vol 12no, 1, p. 942-954- ISSN 0122-0288.

- Pérez, M.G., E. Apaza, y H. Deza. 2006. Congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de camélidos. Allpaqa, revista de investigación del IIPC; Vol. 11 Nro 01. p. 17-23. Puno Perú.
- Perez, G., J. Zevallos, y U. Perez. 2014. Recuperación de espermatozoides de alpacas del conducto deferente durante la época reproductiva Spermova. 2014; 4(2): 139 – 144.
- Quintano, J. 2002. Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (lama pacos) colectados del conducto deferente con el uso de tres dilutores. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.
- Ratto, M., M. Berland, W. Huanca, J. Singh, and G. Adams. 2005. In vitro and in vivo maturation of llama oocytes. Theriogenology; 63: 2445-2457.
- Ratto, M., M. Wolter, C. Gomez, M. Berland and G. P. Adams. 1999. In vitro maturation of lama oocytes. Libro de resúmenes. II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cuzco-Perú.
- Rispatron, J., R. Sánchez, N. Sepulveda, P. Peña, E. Villagran, and W. Miska. 1996. Migration/sedimentation sperm selection method used in bovine in vitro fertilization: comparación with washing/centrifugation theriology. Vol. 46, pp 65-73.
- Rose, T. A. and B. D. Bavister. 1992. Effect of oocyte maturation medium on in vitro development of in vitro fertilized bovine embryos. Mol. Reprod. Develop. Vol. 31, pp. 72-77.
- Ruiz, J.A. y J.E. Correa. 2007. Maduración in vitro de ovocitos de alpaca y llama aspirados vía laparoscópica. I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú.

- Ruiz, J. 2011. Biotecnologías reproductivas aplicadas en la hembra de los camélidos sudamericanos. Capítulo VIII. En: Producción y tecnología en camélidos sudamericanos. Editor: J Ruiz. Huancavelica - Perú.
- Ruiz, J. y L. Landeo. 2014. Avances y Perspectivas de las Fecundación in vitro en Camelidos Sudamericanos. Revista de Ciencias Veterinarias. Vol. 30 N° 4 2014, Lima – Perú.
- Saeki, K., Y. Nao, M. Hoshi, and M. Nagai. 1995. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on in vitro fertilization of bovine oocytes in a protein –free medium. Theriogenology. Vol. 43, pp. 751-759.
- Sansinema, M., S. Taylor, P. Taylor, E. Schmidt, R. Denniston, and R. Godke. 2007. In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. Animal Reproduction Science. 99: 342-353.
- Santayana, P., J. Mendoza, L. Landeo, F. Mujica, y J. Ruiz. 2012. Tiempo de maduración de ovocitos de alpaca en el desarrollo embrionario por fecundación in vitro. VI Congreso Mundial de Camélidos. Arica. Chile.
- Sato, A. y L. Montoya. 1990. Aparato reproductor de la alpaca (*Lama pacos*), Anatomía macroscópica. Rev. Camélidos Sudamericanos. 7, 13.
- Shalgui, R., N. Dekel, and P.F. Kraicer. 1979. The effect of LH on the fertilizability and developmental capacity of rat oocytes matured in vitro. 1. Reprod. Fertil. 55: 429-435.
- Seneda, M. M., C. R. Esper, J. M. Garcia, J. A. Olivera, and R. Vantini. 2001. Relationship between follicle size andultrasound-guided transvaginal recovery. Anim Reprod Sci. 67, 37-43
- SENAMHI .2012. Dirección Regional Puno. Servicio Nacional de Metereologia e Hidrologia. Perú.

- Súss, U., K. Wuthrich, and G. Stranzinger. 1988. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured *in vitro*. *Biol. Reprod.* 38: 871-880.
- Thibault, C. and M. Gerard. 1973. Cytoplasmic and nuclear maturation of rabbit oocytes *in vitro*. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 13: 145-136.
- Tilly, J.L. 1996. Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod* 1:162-172.
- Tilly, J.L., K.I. Tilly, M.L. Kenton, and A.L. Johnson .1995. Expression of members of the Bcl-2 gene family in the immature rat ovary: Equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong Messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 136:232-241.
- Tsafri, A. and C.P. Channing. 1978. Inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis *in vitro*. *Endocrinology* 96: 922-927.
- Vaughan, J., K. Macmillan, and M. D'Occhio. 2004. Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Anim. Reprod. Sci.* 80, 353–361.
- Vanhoutte, L., D. Nogueira, and P. De Sutter. 2009. Prematuration of Human Denuded oocytes in a three-dimensional co-culture system: effects on meiosis progression and developmental competence. *Human Reproduction*. Vol24. N° 3.658-669.
- Wassarman, K.M. and G. Storz. 2000. 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. *Cell*; 101:613–623.
- Zuelke, K. A. and B. D. Brackett .1992. Effects of luteinizing hormone on glucose metabolism in cumulus-enclosed bovine oocytes matured *in vitro*. *Biol. Repr.* Vol. 46, pp. 267.

VIII. ANEXOS

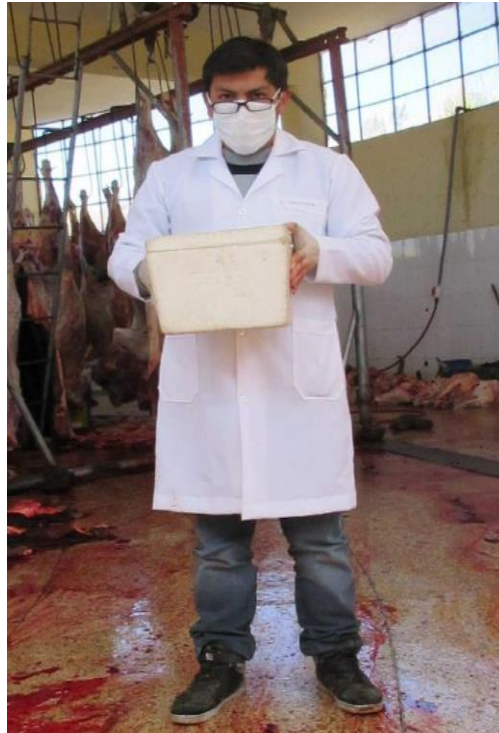


Figura 3: Recolección de ovocitos en el camal



Figura 4: Recolección de suero fetal bovino

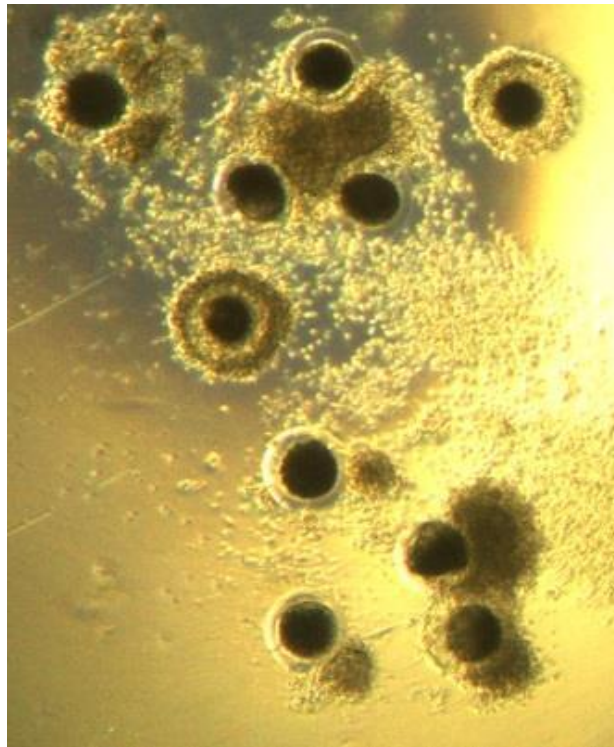


Figura 5: Maduración de ovocitos en medio TCM-199 suplementado

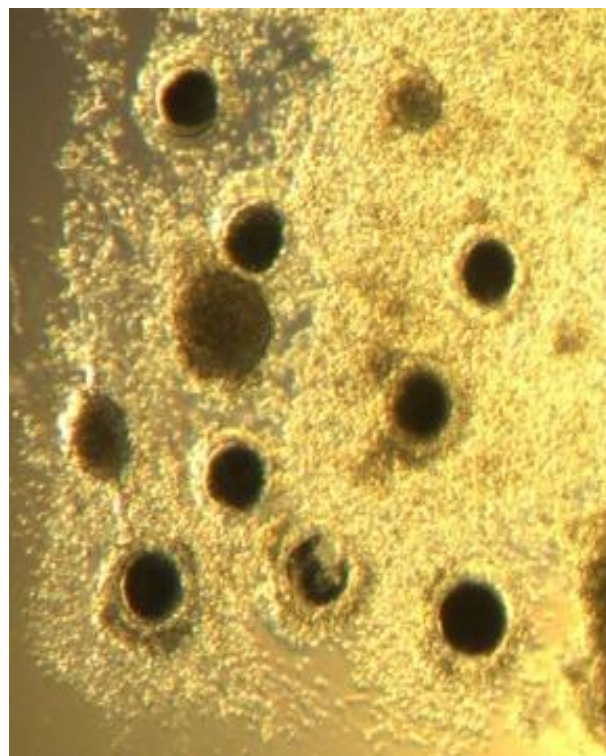


Figura 6: Maduración de ovocitos en medio TCM-199 suplementado con SFB y 2:10 (FSH:LH)

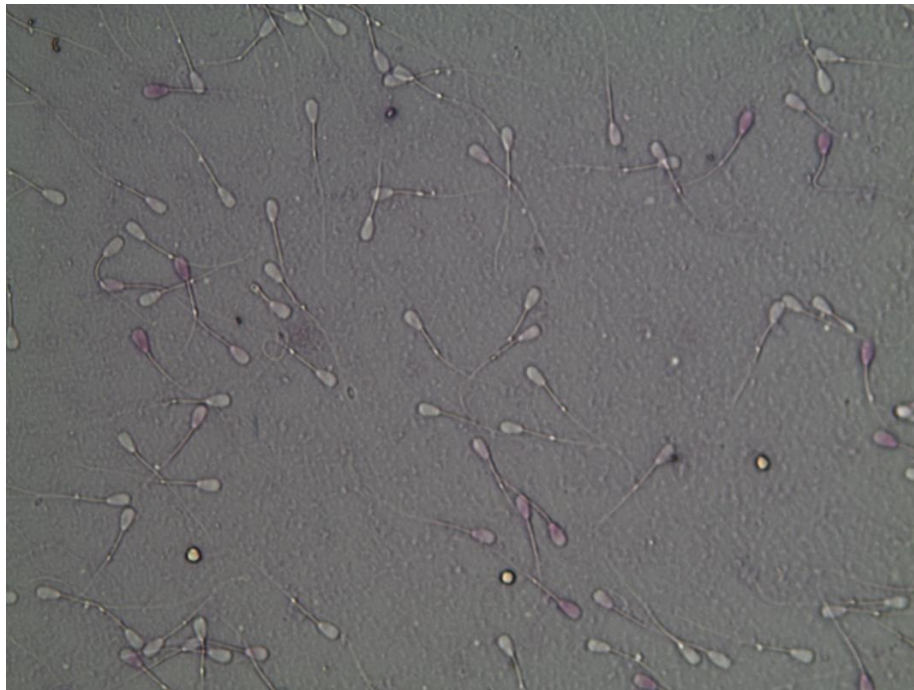


Figura 7: Espermatozoides obtenidos del conducto deferente

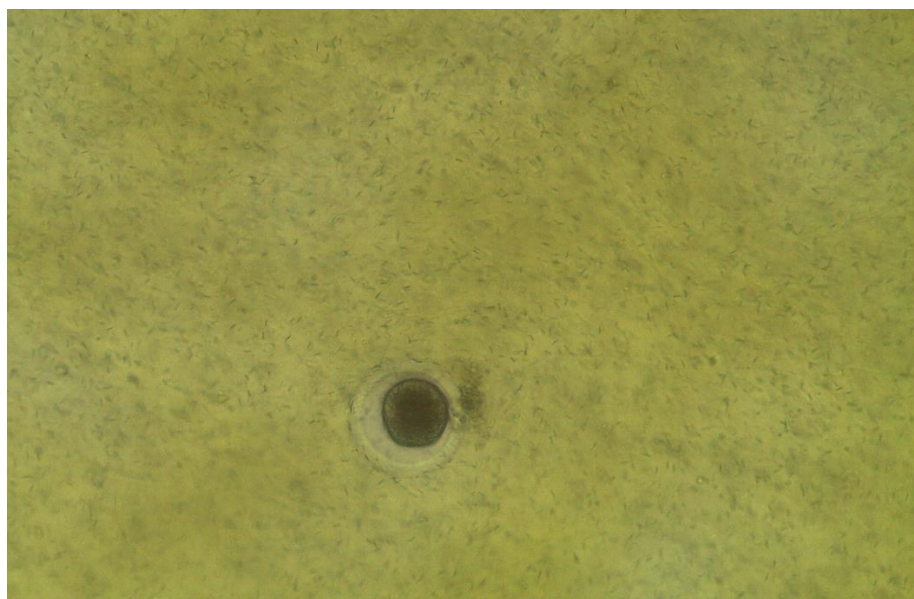


Figura 8: Co-cultivo de ovocito maduro y espermatozoides procedentes del conducto deferente.

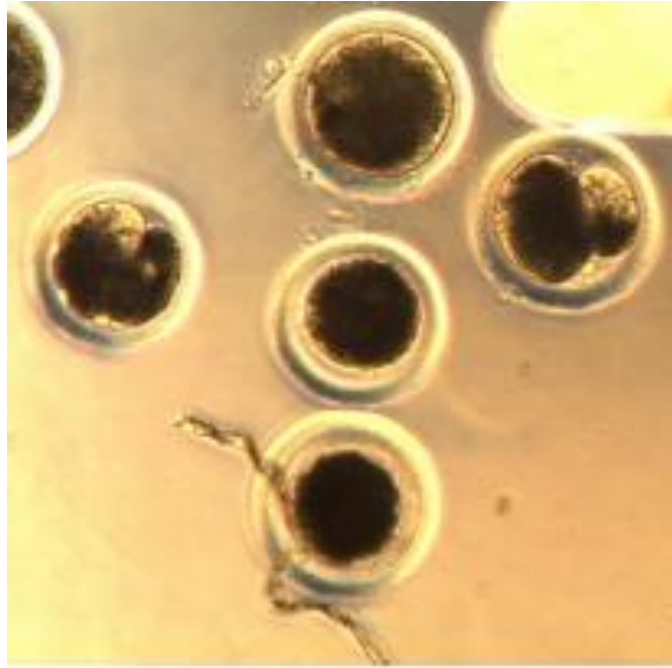


Figura 9: ovocitos que fueron madurados con suplementación de 1:5 (FSH:LH) y que fueron fertilizados por espermatozoides procedentes del conducto deferente

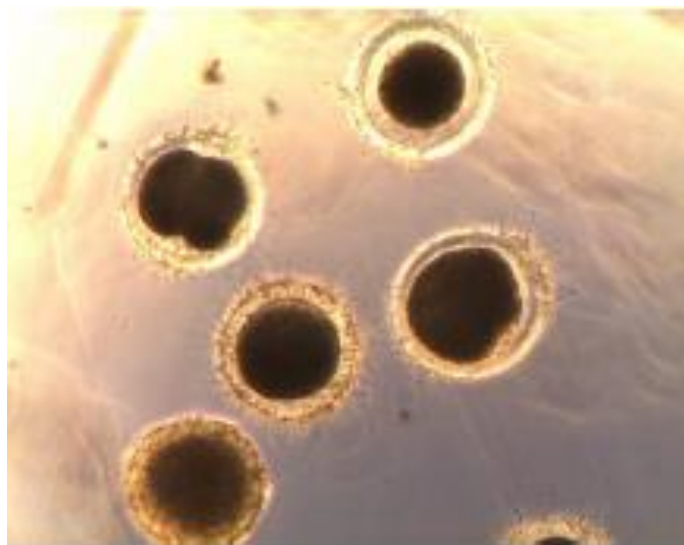


Figura 10: ovocitos que fueron madurados con suplementación de 2:10 (FSH:LH) y que fueron fertilizados por espermatozoides procedentes del conducto deferente

Tabla 4: **REGISTRO DE MADURACION Y FERTILIZACION IN VITRO**

REP=repetición, O=ovocitos, ECO=expansión del cúmulus ophorus, E=elasticidad, Corpúsculo polar, EP=espacio peri vitelino, 2°CP= Segundo

REGISTRO DE MADURACION DE MADURACION Y FERTILIZACION IN VITRO										
TRAT	MADURACION		EVALUACION DE MADURACION					EVALUACION DE FERTILIZACION		
	REP	Nº DE O	ECO	E	CP	EP	TOTAL	2º CP	BLAST	TOTAL
1:5 (FSF: LH)	1	13	///	///	5	6	11	3	4	7
	2	14	///	///	3	9	12	3	3	6
	3	16	//	//	3	8	11	3	5	8
	4	22	//	//	5	10	15	4	5	9
	5	16	//	//	3	8	11	3	4	7
	6	14	//	//	3	7	10	2	4	6
	7	16	//	//	4	6	10	3	3	6
	8	14	//	//	3	6	9	2	3	5
2:10(FSH: LH)	9	13	///	///	2	9	11	3	4	7
	10	16	//	//	3	8	11	3	5	8
	11	16	//	//	4	6	10	3	4	7
	12	17	///	///	4	9	13	3	5	8
	13	14	///	///	2	7	9	4	3	7
	14	16	///	///	5	10	15	4	5	9
	15	14	///	///	3	8	11	3	3	6
	16	18	//	//	3	9	12	3	4	7
		249			55	126	181	49	64	113

cuero polar,BLAST= blastocisto

Tabla 5: Prueba de Ji-cuadrada para maduración de ovocitos

Nº TOTAL DE OVOVITOS MADUROS E INMADUROS					
Maduración	FSH:LH		FSH:LH		(Oj – Ej)²/Ej
	1:5		2:10		
	Oi	Ei	Oi	Ei	
Maduro	89	90.0	36	34.1	0.08
No maduro	92	90.1	32	33.86	0.20
Ji – Cuadrada calculada					0.28
Ji – Cuadrada tabular					0.60
Prueba exacta de Fisher					0.67
					NS (p > 0.05)

Tabla 6: Prueba de Ji-cuadrada para fertilización de ovocitos

Nº TOTAL DE OVOVITOS FERTILIZADOS					
Fertilización	FSH:LH		FSH:LH		(Oj – Ej)²/Ej
	1:5		2:10		
	Oi	Ei	Oi	Ei	
Fertilizo	54	55.6	35	33.4	0.09
No fertilizo	59	57.4	33	34.6	0.14
Ji – Cuadrada calculada					0.23
Ji – Cuadrada tabular					0.63
Prueba exacta de Fisher					0.65
					NS (p > 0.05)

Tabla 7: Medio de Maduración TCM-199 Earle´s salts Disuelta en 1 Lt de DD-agua y agregue 2.2 gr de Bicarbonato de Sodio. Filtre con filtros 0.22 um y guarde en botellas de vidrio. MADURACION DE LOS COC SOLUCION DE TRABAJO

	/mL	2.0 mL	4.0mL
TCM 199 Earle´s salts (stock)	----	1.8 uL	3.6 mL
Suero Fetal bovino (stock)	----	200 uL	400 uL
Piruvato de Sodio (stock)	22 mg	20 uL	40 uL
FSH (stock)	0.5 ug	2 uL	4 uL
LH (stock)	5ug	2 uL	4 uL
Gemtamicina (stock)	50mg	2 uL	2uL

Filtrar con un filtro de 0.22 um

Agregar Estradiol 17B (stock)	1 mg	2 uL	4uL
--------------------------------------	------	------	-----

Prepare: Las gotas y cubra con aceite mineral.

Guarde: Inmediatamente en el incubador.

Tabla 8: Medio de Fertilización FERT-TALP SOLUCION DE TRABAJO

	Cantidad/mL		
FERT-TALP (stock)	----	2.5 mL	5 mL
BSA Fracción V (stock)	6 mg/mL	15 uL	30 mg
Piruvato de Sodio (stock)	10 uL/mL	25 uL	50uL
Gentamicina (stock)	1.0 uL/mL	2 uL	5uL

Filtre: Con filtros de 0.22um

Prepare: Las gotas y cubra con aceite mineral.

Guarde: Inmediatamente en el incubador.