

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



**“INFLUENCIA DEL FLUIDO FOLICULAR Y GONADOTROPINAS
EN LA MADURACIÓN Y FERTILIZACIÓN DE OVOCITOS DE
ALPACAS HUACAYA”**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. DARWIN BENJAMÍN ARQUE MONZÓN

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2017

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

TESIS

“INFLUENCIA DEL FLUIDO FOLICULAR Y GONADOTROPINAS
EN LA MADURACIÓN Y FERTILIZACIÓN DE OVOCITOS DE
ALPACAS HUACAYA”

PRESENTADA POR:

Bach. DARWIN BENJAMÍN ARQUE MONZÓN

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

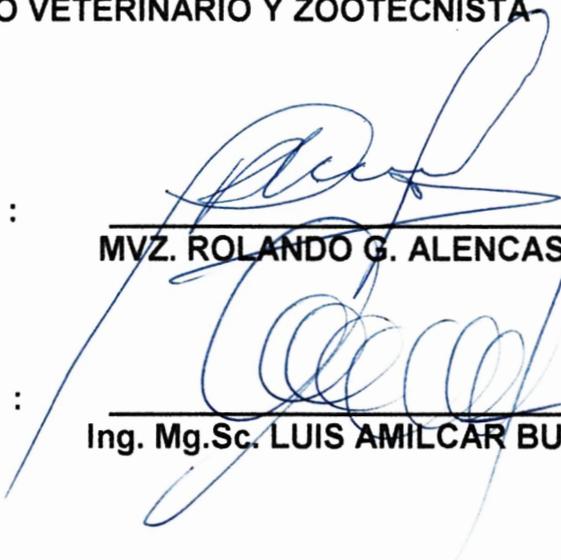
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA



APROBADA POR:

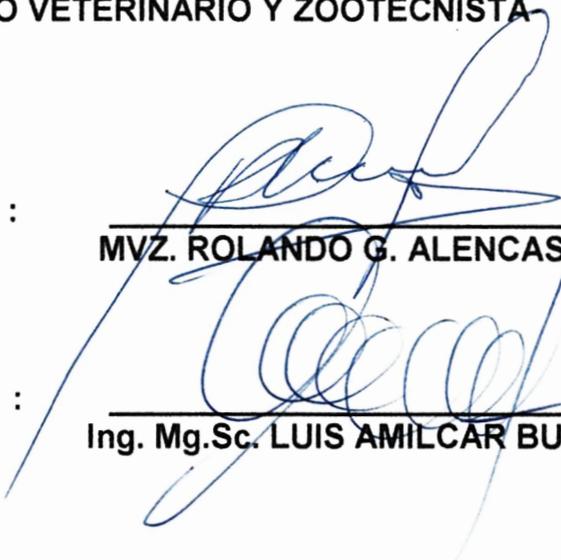
PRESIDENTE

:


MVZ. ROLANDO G. ALENCASTRE DELGADO

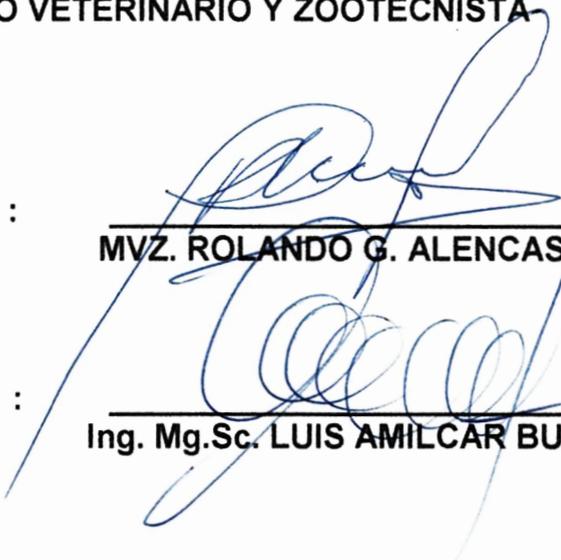
PRIMER MIEMBRO

:


Ing. Mg.Sc. LUIS AMILCAR BUENO MACEDO

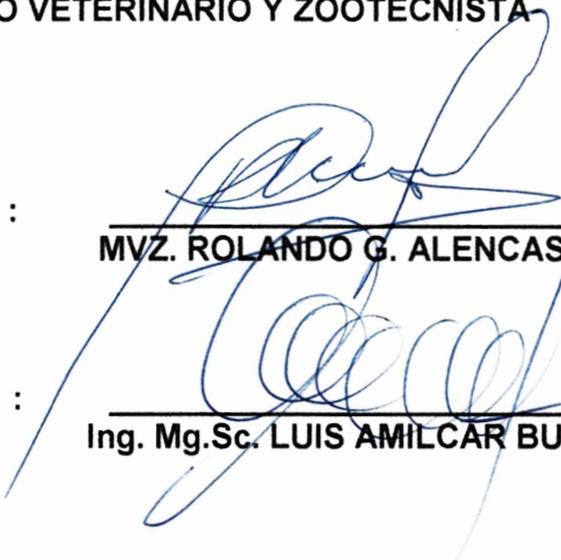
SEGUNDO MIEMBRO

:


Mg. Sc. JUAN GUIDO MEDINA SUCA

DIRECTOR / ASESOR

:


Dr. Sc. MANUEL GUIDO PEREZ DURAND

Área : Reproducción animal

Tema : Conservación de gametos

DEDICATORIA

**A Dios, por guiarme y
haberme cuidado para no
caer en desventuras, y
también a mis angelitos que
siempre estarán presentes
para mí.**

**A mis padres: Victoria
Monzón Mamani y Leonardo
Arque Palomino, quienes
dieron todo su cariño y
trabajo e hicieron posible
que pueda ser profesional.**

**A mis Hermanas Ruth, Silvia,
Karen, Milagros y Roció, y
familiares que siempre me
brindan su apoyo
incondicional.**

A Madeleyne.

MD. Darwin Benjamín Arque Monzón

Agradecimiento

A la Universidad Nacional del Altiplano Puno y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; por haberme formado como profesional.

A los docentes y personal administrativo de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia quienes me inculcaron sus conocimientos y me formaron en esta carrera tan noble pero a la vez desafiante.

Al Dr. Manuel Guido Pérez Durand, maestro en investigación y excelente docente, quien me dirigió en este mundo de la embriología y la investigación, y haberme demostrado que si se puede investigar y solucionar problemas con estudio y creatividad.

A los miembros del jurado revisor del presente trabajo de investigación Dr. Rolando Alencastre Delgado, Ing. Luis Amilcar Bueno Macedo y Dr. Juan Guido Medina Suca, quienes con mucha afabilidad me brindaron las facilidades para poder sustentar el presente trabajo.

A quienes formaban el equipo del Laboratorio de Reproducción Animal en el momento de la ejecución del trabajo de investigación: Reynaldo, Nery y Madeleyne.

A los buenos amigos Clever, Ronnie, Yoel, Angel, Javier, Dante, Noemi, Abad y compañeros del internado CIP- Chuquibambilla 2016-I.

DARWÍN BENJAMÍN ARQUE MONZÓN

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	6
INDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS.....	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
I. INTRODUCCIÓN	11
II. REVISIÓN DE LITERATURA	14
2.1. Ovogénesis.....	14
2.2. Desarrollo de ovocitos y folículos.....	15
2.3. Mantenimiento molecular de la detención durante la meiosis y maduración ovocitaria.	17
2.4. Fluido folicular	18
2.5. Pasos para la realización de la fertilización <i>in vitro</i>	19
2.5.1. Colección de ovocitos	19
2.5.2. Recolección de ovarios en animales post-mortem	20
2.5.3. Método de corte/disección	20
2.5.4. Método de aspiración.....	21
2.5.5. Clasificación de ovocitos	22
2.5.6. Medios utilizados en fertilización <i>in vitro</i>	23
2.5.7. Medios para maduración de ovocitos	23
2.5.8. Fertilización del ovocito.....	25
2.5.9. Medios para la fertilización <i>in vitro</i>	26
2.5.10. Capacitación espermática	26
2.5.11. Reacción acrosómica.....	28
2.5.12. Evaluación de la fertilización.....	29

2.6. Antecedentes de trabajos de fertilización <i>in vitro</i> en camélidos...	29
III. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. Lugar de estudio	35
3.2. Material de estudio	35
3.2.1. Material biológico	35
3.2.2. Equipos de laboratorio	36
3.2.3. Materiales de laboratorio	36
3.3. Metodología.....	38
3.3.1. Colección de ovarios, ovocitos y maduración,.....	38
3.3.2. Evaluación de maduración ovocitaria	41
3.3.3. Fertilización <i>in vitro</i>	42
3.3.4. Evaluación de fertilización.....	44
3.4. Método estadístico.....	44
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
4.1. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos	46
4.1.1. Expansión y visco-elasticidad.....	46
4.1.2. Evaluación de maduración por presencia del primer corpúsculo polar	49
4.2. Fertilización <i>in vitro</i>	52
V. CONCLUSIONES	56
VI. RECOMENDACIONES	57
VII. REFERENCIAS	58
ANEXOS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Expansión de las células del cumulus grado 3.....	46
Figura 2: Ovocito de alpaca con extrusión del primer corpúsculo polar	49
Figura 3: Cigotos a las 24 horas pos FIV	53
Figura 4: Transporte de ovarios (0.9% NaCl + ABT) a 35 °C.....	73
Figura 5: Colección de ovarios de alpacas Huacaya (Nuñoa- Melgar).....	73
Figura 6: Medición de ovarios para tipificación según tratamientos (Fluido de folículos pequeños y grandes)	73
Figura 8: Lavado de ovarios (NaCl 0.9%)	74
Figura 7: Aspiración de FF y COCs	74
Figura 9: Fluido folicular centrifugado	74
Figura 10: Centrifugado de FF a 3500 g. por 30 minutos.....	74
Figura 11: Preparación de medio de maduración (1 mL FF+ 10 uL ABT+ eCG + hCG + heparina)	75
Figura 12: Colección de espermatozoides del conducto deferente.....	75
Figura 13: Cámara portátil de CO2	76
Figura 14: Swim up de espermatozoides de alpaca.....	76

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Categorías de Complejo Cumulus Ovocito (CCOs).....	23
Tabla 2: Distribución de ovocitos para maduración (evaluación de corpúsculo polar) según tratamientos.	35
Tabla 3: Distribución de ovocitos para fertilización in vitro por tratamientos. ..	35
Tabla 4: Grado de expansión y visco-elasticidad de las células del cumulus. 47	
Tabla 5: Maduración in vitro por presencia del primer corpúsculo polar (%) ...	50
Tabla 6: Tasas de fertilización por la presencia de blastómeros (%).....	52
Tabla 7: Resultados de tratamiento 1 fluido de folículos pequeños (2-4mm) .	68
Tabla 8: Resultados de tratamiento 2 fluido de folículos grandes (>7mm)	68
Tabla 9: Resultados de tratamiento 3 Control (TCM-199)	68
Tabla 10: Ji-cuadrado para comparar proporciones de ovocitos con presencia de primer corpúsculo polar.....	69
Tabla 11: Ji-cuadrado para comparar proporciones de ovocitos fertilizados por división celular.....	69
Tabla 12: ANVA para evaluar media de expansión y elasticidad.	69
Tabla 13: Estadísticos para expansión y elasticidad.	69
Tabla 14: Prueba de comparación múltiple de Tukey (0.05)	69

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

FF	Fluido folicular
FFp	Fluido de folículos pequeños
FFg	Fluido de folículos grandes o preovulatorios
FSH	Hormona folículo estimulante
LH	Hormona luteinizante
COCs	Complejo cúmulos ovocitos
TCM	Medio de cultivo tisular
mPBS	Medio de solución buffer fosfatada
μL	Microlitro
mL	Mililitro
g	Gramo
g.	Gravedades
mM	Milimolar
UI	Unidad internacional
mm	Milímetro
cm	Centímetro
PHE	Penicilamina, hipotaurina y epinefrina
Rpm	Revoluciones por minuto
HEPES	Solución tampón
eCG	Gonadotropina corionica equina
hCG	Gonadotropina corionica humana
CO ₂	Dióxido de carbono
°C	Grados centígrados
FIV	Fertilización in vitro
MIV	Maduración in vitro
SFB	Suero fetal bovino
KSOM	Medio de optimización simple de potasio

RESUMEN

El presente estudio 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 de maduración y fertilización de ovocitos de alpacas utilizando como medio de maduración el fluido folicular según tamaño de folículo. Se utilizaron 523 ovocitos que se dividieron en tres tratamientos (T): T1=Fluido de folículos pequeños (2-5mm) (189 ovocitos), T2=Fluido de folículos grandes (> 8mm) (173 ovocitos), T3=TCM 199 (170 ovocitos), todos suplementados con 2 UI de eCG y 10 UI hCG. En la maduración se evaluó el grado de expansión y viscoelasticidad de las células del cumulus ophorus, y la presencia del primer corpúsculo polar. Posterior a la maduración se realizó la fertilización con espermatozoides del conducto deferente capacitados por swim up. La evaluación de fertilización de los ovocitos se realizó por la observación de división celular de los cigotos. Los resultados fueron para expansión y visco-elasticidad T1=2.35, T2= 2.73 y T3= 2.25 ($p<0.05$), para maduración observando la presencia corpúsculo polar se obtuvo T1=58 % , T2=67 % y T=54 % ($P>0.05$), mientras para fertilización se obtuvo T1=50,79 %; T2=53.76 %y T3= 49.41 %, respectivamente, no existiendo influencia ($P>0.05$), sin embargo el tratamiento con fluido de folículos grandes o pre-ovulatorios tiene los valores más altos en maduración, factor principal para la fertilización *in vitro*. En conclusión el fluido folicular recuperado según tamaño del folículo (pequeños y pre-ovulatorio) utilizado como medio de maduración no muestran influencia ($p>0.05$) en la maduración según la proporción por extrusión del primer corpúsculo polar, por lo tanto este resultado indicaría que la composición de los factores de maduración ovocitaria y componentes nutritivos no son determinantes y la proporción en fertilización *in vitro* de ovocitos de alpacas madurados en fluido de folículos grandes y pequeños son similares, no existiendo dependencia estadística ($p>0.05$), este resultado ratifica los resultados de maduración.

Palabras clave: alpacas, biotecnología, *in vitro*, fluido folicular.

ABSTRACT

The present study 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 maturation and fertilization of alpaca oocytes using follicular fluid according to follicle size as a means of maturation. We used 523 oocytes that were divided into three treatments (T): T1 = Fluid of small follicles (2-5mm) (189 oocytes), T2 = Fluid of large follicles (> 8mm) (173 oocytes), T3 = TCM 199 (170 oocytes), all supplemented with 2 IU of eCG and 10 IU hCG. In the maturation, the degree of expansion and viscoelasticity of the cells of the cumulus ophorus, and the presence of the first polar corpuscle were evaluated. After fertilization, fertilization was performed with sperm from the vas deferens trained by swim up. The fertilization evaluation of the oocytes was carried out by observation of zygote cell division. The results were for expansion and viscoelasticity T1 = 2.35, T2 = 2.73 and T3 = 2.25 ($p < 0.05$), for maturation observing the polar corpuscle presence T1 = 58%, T2 = 67% and T3 = 54% were obtained ($P > 0.05$), while for fertilization T1 = 50.79% was obtained; T2 = 53.76% and T3 = 49.41%, respectively, there being no influence ($P > 0.05$), however the treatment with fluid of large follicles or pre-ovulatory has the highest values in maturation, main factor for in vitro fertilization. In conclusion follicular fluid recovered according to the size of the follicle (small and pre-ovulatory) used as a means of maturation showed no influence ($p > 0.05$) on maturation according to the proportion by extrusion of the first polar corpuscle, therefore this result would indicate that the composition of the oocyte maturation factors and nutritional components are not determinant and the proportion of in vitro fertilization of alpaca oocytes matured in large and small follicular fluid are similar, there being no statistical dependence ($p > 0.05$), this result ratifies the maturation results.

Key words: alpacas, biotechnology, in vitro, follicular fluid.

I. INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos, son originarios de países como Perú, Chile, Argentina, Bolivia, pero hoy en día se ha extendido a Estados Unidos, Italia y Australia donde existe un gran interés por ellos. Las cuatro especies de camélidos sudamericanos son: La alpaca (*Vicugna pacos*) y la llama (*Lama glama*) son domésticos, mientras la vicuña (*Vicugna vicugna*) y el Guanaco (*Lama guanicoe*) son silvestres; siendo la alpaca la especie de mayor población en el Perú que según INEI 2012, contabilizo 3 685 516 alpacas de los cuales el 78,93% (2 909 212) son de raza Huacaya y de esta población Puno cuenta con el 41.58 %(1 209 716). El principal producto de la crianza de alpacas es la fibra de características muy favorables para la industria textil (Trasorras y Miragaya, 2016).

El fluido folicular desempeña función de vital importancia en la esteroriogénesis, crecimiento folicular, maduración de los ovocitos, en la ovulación y transporte del ovocito por el oviducto (Gordon, 1999). El fluido folicular también provee otras funciones al ovocito y granulosa facilitando el transporte de los nutrientes del plasma sanguíneo (Hafez y Hafez, 2000). El fluido folicular es una solución que se origina de trasudación de la sangre a través de las capas de la granulosa, tiene un pH de 7.4 similar al plasma, los componentes importantes del fluido folicular son componentes inorgánicos, carbohidratos, lípidos, vitaminas, proteínas, hormonas en cantidad y calidad (Salisbury *et al.*, 1978).

Utilizado como medio de maduración y fertilización de ovocitos de vacunos lograron resultados así Choi *et al.* (1998) lograron un 72% de maduración y 31% de embriones utilizando fluido folicular de diferentes estados. Coleman *et al.* (2007) reportaron el 70.4% de fertilización y 50.8% de mórulas utilizando fluido folicular más porciones de pared folicular. Mientras que Avery *et al.* (2003)

reportaron 42% de fertilización y 4% de blastocitos utilizando fluido folicular de diferentes orígenes.

Las biotecnologías reproductivas aplicables en alpacas para incrementar el número de crías de animales elite se mantienen en constante investigación, no encontrándose aún protocolos comerciales para la masificación de algunas de estas técnicas (transferencia de embriones, inseminación artificial, crio-conservación de gametos, fertilización *in vitro*, clonación, etc.), debido a que la alpaca posee características tanto anatómicas y fisiológicas que dificultan la implementación de estas técnicas. (Ruiz, 2015)

La fertilización *in vitro* es una de las biotecnologías de mayor desarrollo en el mundo ya que permite realizar evaluación eficiente de capacidad fertilizante de espermatozoides y ovocitos (Brackett *et al.*, 1983); difusión del uso de semen valioso y escaso, así como también la prolongación de la vida reproductiva de animales genéticamente valiosos, inmaduros o muy viejos (Brackett *et al.*, 1982); desarrollo de las condiciones adecuadas para implementar otras técnicas reproductivas en el campo de la micro manipulación de embriones, creación de bancos de gametos provenientes de animales seleccionados por excelencia productiva y/o adaptabilidad y sexsage de embriones antes de la transferencia (Greve *et al.*, 1993), en conclusión poder duplicar el número de crías que una hembra puede tener durante toda su vida productiva y optimizar el uso de espermatozoides, por ello es necesario el estudio de la composición y el manejo adecuado, tanto del fluido folicular y de las secreciones oviductales que son los medios que se tratan de imitar en la fertilización *in vitro*.

En el presente trabajo de investigación se utilizó como medio de maduración de los ovocitos de alpacas el fluido folicular de folículos pequeños y pre- ovulatorios y el efecto que estos tienen a su posterior fertilización.

Para evaluar el efecto de la maduración ovocitaria en vista de esta fisiología del crecimiento folicular difiere con la de las vacas de ovulación espontanea, mientras que en los camélidos la ovulación es inducida, probablemente los componentes foliculares durante estas fases varíen y actúen de forma diferente.

Para lo cual se planteó los siguientes objetivos:

- Determinar el porcentaje de maduración de los ovocitos utilizando como medio de maduración el fluido folicular (de folículos pequeños y pre-ovulatorios, mas gonadotropinas exógenas)
- Determinar el porcentaje de fertilización de los ovocitos madurados en los tratamientos anteriores.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Ovogénesis

La ovogénesis comprende una organización y procesos complejos, regulado por un gran número de factores intra y extra ováricos, desde células germinales hasta ovocitos fertilizables. Las ovogonias, que se originan de células germinales primordiales, proliferan por mitosis y forman los ovocitos primarios que son arrestados en el estado de profase de la primera división meiótica. Dentro de los ovocitos primarios, la síntesis y acumulación de ácidos ribonucleicos (ARNs) y proteínas a través de ovogénesis son esencial para crecimiento y maduración del ovocito, y además, crucial para el desarrollo interno del embrión después de la fertilización (Hillier *et al.* 2010). Comienza con las ovogonias, que se derivan de las células germinales primordiales en el embrión, este proceso comienza antes del nacimiento, cuando células (Herradón, Quintela, Becerra, Ruibal, & Fernández, 2007) del origen epitelial se van agrupando alrededor de la membrana limitante del ovocito. Las células germinales primordiales se diferencian del epitelio del saco vitelino durante el desarrollo embrionario, migran a través del mesenterio y se exteriorizan en las crestas genitales. Todos los óvulos potenciales alcanzan la gónada primitiva en esta fase temprana y prolifera alrededor del día 50 hasta el día 130 de la gestación. La célula germinal del primordio se convierte en una ovogonia cuando la gónada primitiva se diferencia en ovario (Gigli *et al.* 2006; Salisbury *et al.* 1978; Alvaro 2003).

2.2. Desarrollo de ovocitos y folículos

El desarrollo de los folículos hasta el estadio primario es lento, lleva años, pero una vez que se reinicia el crecimiento se lleva a cabo en tres semanas aproximadamente. Shamsuddin et al., (1993), mencionan que en comparación con las células somáticas, las cuales normalmente miden 10 μm , este proceso además de largo, es extremoso en lo que respecta al incremento de tamaño del ovocito.

Francois et al., (1997) mencionan que periódicamente cierto número de folículos primordiales inician su crecimiento. Cada ovocito está dentro de un folículo con una sola capa de células epiteliales o granulosa, y una del mesénquima o células tecales, conforme aumenta el número de capas de células de la granulosa, el ovocito secreta una sustancia mucoide rica en glicoproteínas, la cual forma una banda (que se convierte en la zona pelúcida) entre el núcleo y las capas celulares. Finalmente, cuando el crecimiento cesa, el ovocito incrementa hasta 500 veces su tamaño, y está rodeado de varias capas de células granulosa y células tecales además, de un núcleo grande o vesícula germinativa (VG).

Posteriormente, se van formando algunos espacios celulares llamados antros foliculares, los cuales se van llenando con líquido rico en hormonas esteroides, peptídicas (incluyendo la oxitocina y relaxina), prostaglandinas y varios factores de crecimiento locales, cuyas concentraciones son mayores que las sanguíneas, y para las cuales existen moléculas receptoras en toda la pared del oviducto (Choi et al., 1998). Conforme aumenta el antro, las células de la granulosa siguen proliferando y forman un hilillo que atrae al ovocito hacia el centro y lo rodean formando el complejo cúmulo ovocito

(COC) permaneciendo así hasta la ovulación (Shamsuddin et al., 1993 y Griffin y Ojeda, 1992).

Este período de encierro, se cree que es mantenido por un factor inhibitor producido por las células foliculares. Los ovocitos permanecen en este encierro, hasta que son estimulados durante la pubertad por el pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH). En respuesta a esta hormona se reinicia la maduración nuclear, por lo que varios autores afirman que los cambios nucleares son dependientes de las hormonas esteroides (Shamsuddin et al., 1993).

Las ovogonias se diferencian en ovocitos cuando comienzan la meiosis. Durante el desarrollo fetal, las ovogonias sufren una serie de divisiones mitóticas que finalizan en la formación de ovocitos. En el bovino se observan figuras meióticas a partir del día 82 de gestación (Gigli *et al.* 2006). Se detienen en la profase meiotica. La mitosis ovogónica se completa al nacimiento y no se forma después nuevos ovocitos hasta algunas semanas después del nacimiento. El núcleo de estos ovocitos es casi esférico y su crecimiento es proporcional a la variación de tamaño de todo el ovocito. En esta fase hay un cuerpo vitelino o centrósfera junto al núcleo, una zona mitocondrial que rodea a la centrósfera y al núcleo y un citoplasma periférico. Poco después, conforme se produce el crecimiento, las mitocondrias se fragmentan y se dispersan por todo el citoplasma o en su periferia. Los cuerpos de Golgi se hallan al principio reunidos a un lado del núcleo y alrededor de la centrósfera y más tarde se diseminan por todo el citoplasma (Salisbury *et al.*, 1978).

Durante las fases de crecimiento primitivo los ovocitos no desarrollados descansan cerca de la superficie del ovario, cada uno de ellos rodeado por una capa de células planas. Conforme el folículo y el ovocito crecen van hundiéndose más profundamente en la corteza del ovario, durante la primera parte del crecimiento tanto el folículo como el ovocito varían de tamaño, pero el folículo continúa creciendo mucho después de que el óvulo haya dejado de crecer, las mitocondrias y los cuerpos de Golgi se dispersan en el citoplasma. El desarrollo folicular comienza con el aumento de su tamaño y número de células planas rodean al ovocito, dichas células se hacen gradualmente cúbicas y después prismáticas, la única capa se hace doble luego triple, las células se hacen de nuevo cúbicas y se forman más capas al rededor del ovocito, en el bovino se ha estimado la presencia de 42.000 - 325.000 folículos primordiales, la mayoría se atresian antes de adquirir las condiciones de folículo preovulatorio, estos folículos forman la reserva gametogénica o “población de folículos de reserva” que una hembra va a utilizar en toda su historia reproductiva, es a partir de esta población “estática y durmiente” que se origina toda la población de folículos en crecimiento (Gigli *et al.* 2006; Salisbury *et al.* 1978).

2.3. Mantenimiento molecular de la detención durante la meiosis y maduración ovocitaria.

La adquisición de la competencia meiótica ocurre alrededor del momento de formación del antro (Erikson y Sorensen, 1974; Sorensen y Wassarman, 1976; Mehlmann *et al.*, 2004) y se corresponde con el momento en el que el ovocito alcanza un nivel umbral de proteínas promotoras de la maduración

como la quinasa 1 dependiente de ciclina (CDK1) y la ciclina (Conti *et al.*, 2002).

A pesar de tener la capacidad para madurar, el ovocito permanece detenido en profase I hasta el momento del pico de LH preovulatorio que es regulado por los niveles intracelulares de AMPc. Es más, si se aísla el ovocito del folículo, tiene lugar la maduración espontánea y descienden los niveles de AMPc (Törnell *et al.*, 1990). Por el contrario, la reanudación de la meiosis puede evitarse con análogos de AMPc permeables a la membrana o inhibidores de la fosfodiesterasa de AMPc (Conti *et al.*, 2002).

2.4. Fluido folicular

El fluido folicular desempeña función de vital importancia en la esteroidogénesis, crecimiento folicular, maduración de los ovocitos, en la ovulación y transporte del ovocito por el oviducto (Gordon 1999). El fluido folicular también provee otras funciones al ovocito y granulosa facilitando el transporte de los nutrientes del plasma sanguíneo (Hafez y Hafez 2000). El fluido folicular es una solución que se origina de trasudación de la sangre a través de las capas de la granulosa, tiene un pH de 7.4 similar al plasma, los componentes importantes del fluido folicular son componentes inorgánicos, carbohidratos, lípidos, vitaminas, proteínas, hormonas en cantidad y calidad (Salisbury *et al.* 1978).

La composición química del fluido folicular de alpacas mediante la técnica de espectrofotometría, mostró resultados para proteína total (g/dl) 8,26 y 7,26; albúmina (g/dl) 4,75 y 5,29; glucosa (g/l) 3,56 y 3,31; lípidos totales (g/l) 0,3815 y 0,2775; colesterol (g/dl) 0,1039 y 0,09375 en folículos secundarios

(<7 mm) y terciarios (>7 mm) respectivamente. Estos resultados indican que no existen grandes diferencias entre ambos grupos por lo que el fluido de folículos secundarios también puede usarse en el enriquecimiento de medios de cultivos para gametos en esta especie (Pacheco y Coila, 2010).

El estradiol intra-folicular aumenta de acuerdo al crecimiento del folículo, y decrece significativamente al entrar al estado de atresia. Es así que la concentración de estradiol intrafolicular durante la fase de crecimiento es de 13.2 ± 11.3 ng/ml, durante selección de 108.4 ± 54 ng/ml, durante la fase de dominancia entre 234 y 566 ng/ml, mientras que en la atresia de 4.2 ± 2.8 ng/ml. (Lázaro, 2016) por lo tanto las concentraciones de estradiol y su aromatización en las células de la granulosa son fundamentales para la madurez ovocitaria y la calidad de recuperación de ovocitos.

2.5. Pasos para la realización de la fertilización *in vitro*

2.5.1. Colección de ovocitos

Los ovarios contienen un elevado número de folículos que se encuentran en diferentes estados de desarrollo (primordiales, en crecimiento, atrésicos) de los cuales, solamente una pequeña proporción va a ser utilizada durante la vida reproductiva del animal. La recolección de ovocitos permite recuperar y aprovechar folículos no ovulatorios, que bajo condiciones fisiológicas se tornarían en folículos atrésicos, con el fin de aprovechar el máximo potencial genético de una donadora por procedimientos *in vitro* (Gordon, 1990). La recolección de ovocitos para el desarrollo de tecnologías *in vitro* se puede realizar de las siguientes formas:

a) Recolección en animales post-mortem: Se pueden recoger por aspiración de folículos visibles o mediante el método de corte de la superficie e interior del ovario. (Herradon, 2007)

b) Recolección en animales vivos: En animales vivos la recolección de ovocitos se puede realizar por aspiración transvaginal guiada por ultrasonido y por laparoscopia / laparotomía. (Díez, 2010)

2.5.2. Recolección de ovarios en animales post-mortem

La obtención de ovarios provenientes de camélidos en el matadero es una fuente de ovocitos a bajo costo y de fácil manejo, los ovarios de las hembras al momento de la colección se encuentran en diferentes estados del ciclo estral, estos que pueden ser madurados, fertilizados y cultivados in vitro hasta estados avanzados del desarrollo embrionario. Se deben evaluar los factores externos que están involucrados en la manipulación de los ovocitos antes de realizar el cultivo, ya que estos pueden afectar la expresión de la competencia del desarrollo. La competencia de desarrollo se puede definir como la habilidad que tiene el ovocito fertilizado de formar embriones hasta estados avanzados (blastocisto) (Blondin *et al.* 1995).

2.5.3. Método de corte/disección

En un estudio realizado por Vásquez *et al.*, (2017) con ovarios de alpacas y llamas describe que el ovario fue colocado a una placa petri de vidrio (14 x 93mm) que contenía 2 mL de Tampón Fosfato Salino (PBS), para realizar el corte del ovario se fija con una pinza hemostática curva y los cortes se realizaron 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. El contenido de la placa petri donde se realizó el corte, se vierte a otra placa petri dejando en reposo por 10 min a 35°C sobre la platina térmica para su posterior búsqueda de los ovocitos con el estereoscopio a 25X en el cual con ayuda de la pipeta capilar unida a una jeringa de tuberculina se aspiraron los ovocitos para luego trasladarlos a otra placa petri (10 x 36 mm) que contenía 2 mL de PBS para su posterior evaluación

2.5.4. Método de aspiración

Se someten a este procedimiento, folículos superficiales 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 contenía 1mLde Tampón Fosfato Salino (PBS), el contenido de la aspiración fue vertida a una placa petri (10 x 36mm) y mantenido a 35°C sobre la platina térmica por 5 min para la sedimentación de los ovocitos. Una vez sedimentado los ovocitos en la placa Petri (10 x 36 mm) se procedió a la búsqueda de los ovocitos con el estereoscopio a 25X en el cual con ayuda de la pipeta capilar unida a una jeringa de tuberculina se aspiraron los ovocitos para luego trasladarlos a otra placa petri (10 x 36 mm) que contenía 2mL de PBS para su posterior evaluación. (Vásquez *et al.*, 2017).

2.5.5. Clasificación de ovocitos

Una etapa crítica en el procedimiento de producción in vitro de embriones consiste en la evaluación morfológica de los ovocitos para determinar su potencial fertilizante.

Morfología

El primer método para discriminar entre ovocitos competentes e incompetentes para el desarrollo embrionario es la morfología del citoplasma y de las células del cumulus. La calidad de las envolturas celulares que rodean el ovocito y la apariencia del citoplasma son los mejores indicadores del potencial que éste posee para la maduración y fertilización in vitro (Leibfried *et al.* 1989).

Las células del cumulus son subpoblaciones de células de la granulosa las cuales proveen de nutrientes al ovocito durante el crecimiento, participan en la formación de la zona pelúcida y sintetizan la matriz compuesta de ácido hialurónico y proteínas que juegan un papel importante en el transporte del ovocito a través del oviducto y permiten atrapar al espermatozoide para la fertilización (Arlotto *et al.* 1996).

Cada laboratorio establece un tipo de clasificación para los ovocitos recuperados que se van a someter a procedimientos in vitro. Los ovocitos pueden ser clasificados 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 tipo A y B poseen un elevado potencial para desarrollarse a embriones por FIV (Lonergan *et al.* 1991).

Tabla 1: Categorías de Complejo Cumulus Ovocito (CCOs)

Grado	Capas de células del Cumulus	Citoplasma
A	Capas múltiples, compactas de células de cumulus (> 4).	Homogéneo y transparente
B	Capas múltiples, compactas de células de cumulus (1 a 3).	Homogéneo con zonas periféricas oscuras.
C	Desnudados	Irregular con zonas oscuras.
D	Células expandidas	Irregular con zonas oscuras.

Fuente: Lonergan *et al.* 1991.

2.5.6. Medios utilizados en fertilización in vitro

Una vez seleccionados los ovocitos, están dispuestos a colocarlos en los diferentes medios hasta lograr el embrión esperado, los medios tienen que cumplir con ciertas características para que dichos ovocitos, maduren, fertilicen y desarrollen hasta la edad de blastocito para poder darle el uso correspondiente. Para conseguir este desarrollo se utilizan diferentes medios, pero los habituales son TCM 199, TALP, B2 de menezos o el Waymounth 752/1 y entre otros para la fertilización y desarrollo del embrión (Barry *et al.*, 1992; Parrish *et al.*, 1986).

2.5.7. Medios para maduración de ovocitos

Para el medio de maduración se utilizan los diferentes medios de cultivo de células, entre la más recomendada está el TCM-199 al cual

se adiciona 0.25 mM de piruvato de sodio, 6 mg/ml de seroalbumina bovina, 1 ug/ml de estradiol, 10 ug/ml de LH ovina, 0.5 ug/ml de FSH y 100 U.I./ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomicina, 0.25 ug/ml de anfoterecina (Barry *et al.*, 1992; Thibodeaux *et al.* 1992; Mozzaquatro *et al.* 2004).

Un protocolo de maduración se puede hacer en medio TCM- 199, suplementado con 10% de 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 estradiol (Huanca *et al.*, 2014).

Posteriormente los ovocitos con cumulus ophorus intacto, con citoplasma granulado y de tamaño grande se seleccionan para la maduración (Barry *et al.* 1992; Thibodeaux *et al.* 1992; Mozzaquatro *et al.* 2004). Los ovocitos son lavados 2 veces con el medio de maduración el cual ha sido equilibrado con 5% de CO₂ dentro el aire. La maduración in vitro se realiza en incubadora de CO₂, a 39 °C, 5% de CO₂ y humedad relativa alta, por 42 horas (Huanca *et al.*, 2014)

Valoración de la maduración in vitro

- Expansión de las células del cumulus
- Extrusión del 1er corpúsculo polar 50% de pérdida
- Maduración nuclear; Fijación ovocito: etanol/ácido acético, paraformaldehido Lacmoide, orceina (óptico), Hoechst, DAPI, yoduro de propidio (fluorescencia)
- Maduración citoplasmática; cambios ultra estructurales, es poco práctico (Chian *et al.* 1992).

2.5.8. Fertilización del ovocito

Fertilización

Se denomina fertilización a la serie de eventos que ocurren entre el esperma y el tracto reproductivo de la hembra y entre los espermatozoides y el ovocito, que dan por resultado la fusión de gametos formándose un pro núcleo femenino y otro masculino que se fusionan dando por resultado la formación de un cigoto. (IRAC 2004).

Swim-up

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, swim-up, gradiente de percoll, filtración en columna con lana de vidrio y migración-sedimentación (Tea *et al.*, 1983; Parrish *et al.*, 1986; Stubbingns *et al.*, 1991; Avery y Greve, 1995; Risopatrón *et al.*, 1996) El método de swim-up desarrollado por ; Parrish *et al.*, 1986 separa los espermatozoides motiles de los no motiles, gracias a la motilidad intrínseca de los espermatozoides, para ello una muestra de semen colocada en el fondo de un tubo de ensayo que contiene medio de cultivo SPERM TALP a 37 °C, permitirá después de un tiempo de cultivo, que los espermatozoides motiles se desplacen hacia la superficie del tubo, de manera que si retiramos la parte superior habremos seleccionado los espermatozoides más capaces de fertilizar el ovocito (Parrish *et al.*, 1986).

2.5.9. Medios para la fertilización *in vitro*

El grupo de ovocitos madurados son movidos y lavados 3 veces en el medio de fertilización TL HEPES, luego inseminados en una gota de 50 μ L de TALP conteniendo 2 μ g/mL de heparina con 0.6 a 2.0 x 10⁶/mL de espermatozoides separado del sobrenadante y cultivados bajo el 5% de CO₂ dentro de aire con alta humedad a 39°C por 18 h (Barry et al. 1992; Mozzaquatro *et al.* 2004). En bovinos se usa pajillas congeladas, previamente probadas en procedimientos de fertilización *in-vitro*, que son descongelados en agua de 30°C por 30 s. El espermatozoide es colocado en capas discontinúas de (90/40: v/v) en medio de gradientes de percoll y centrifugados a 1800 rpm por 30 min. El sedimento resultante es lavado 2 veces en el medio TALP esperma, por centrifugación a 1800 rpm por 5 minutos. Finalmente la preparación es ajustado a aproximadamente 10 x 10⁶ de espermatozoides mL y en igual volumen de 200 μ g de heparina mL⁻¹ dentro el medio TALP esperma es adicionado. Después de 3 horas de incubación a 39°C, los espermatozoides son adicionados a los ovocitos madurados. Los ovocitos llegan a fertilizarse y mostrarse divisiones de más de dos células más 50% (Tosti et al. 2002; Mozzaquatro *et al.* 2004).

2.5.10. Capacitación espermática

La capacitación es un proceso reversible que implica la eliminación, migración y aparición de distintos componentes de la membrana plasmática. La eliminación implica la remoción de las glicoproteínas de la membrana plasmática adquiridas durante el paso por el

epidídimo y el contacto con el plasma seminal. Un útero estimulado in vivo con estrógeno es óptimo para la capacitación. Los glicosaminoglicanos producidos por las células del oviducto son responsables de inducir el proceso de capacitación espermática (Johnson y Everitt, 1988).

Primero, el acrosoma se hincha y sus membranas se fusionan en varios puntos con la membrana plasmática. Este proceso llamado “reacción acrosómica”, crea una apariencia vesicular y expone el contenido de la vesícula acrosómica.

Segundo, en la zona del acrosoma se produce un cambio en la superficie de la membrana a la altura de la zona ecuatorial (mitad posterior de la cabeza) del espermatozoide. Hasta este momento la membrana era incapaz de fusionarse con la superficie de la membrana del huevo, pero después de la activación la membrana se transforma en “fusionable” (Johnson y Everitt, 1988).

Tercero, hay un cambio en los movimientos de la cola del espermatozoide, produciéndose la hiperactivación de la cola. Las ondulaciones regulares como las de un flagelo, se reemplazan por movimientos más episódicos con mayor amplitud que empujan al espermatozoide hacia adelante. Estos movimientos de la cola se desarrollan probablemente con anticipación a la inminente necesidad de penetrar las células del cúmulo y zona pelúcida (ZP). Un hecho importante en el bovino es que los ovocitos pierden las células del cúmulo rápidamente después de la ovulación. Por lo tanto no hay

muchas células presentes en el momento de la fertilización (Johnson y Everitt, 1988).

2.5.11. Reacción acrosómica

El término “reacción acrosomal” indica cambios que conducen a la pérdida del acrosoma por parte de los espermatozoides alrededor de los ovocitos en el oviducto. En los espermatozoides que sufren la reacción acrosomal, la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa de todo el capuchón acrosomal se fusionan y luego se vesiculan siguiendo una secuencia. El proceso conduce a la pérdida de la matriz acrosomal y enzimas a través de los poros de esta capa hacia el espacio extracelular (Hafez y Hafez, 2000).

A la vez que aprendemos más acerca de los detalles de la fertilización, paradójicamente se ha transformado en una gran incógnita la naturaleza exacta del estímulo que inicia la reacción acrosomal. De las aproximadamente doce enzimas conocidas del acrosoma, las más importantes para la función espermática en la fertilización parecen ser la hialuronidasa y la acrosina. Esta última se acumula en forma de cimógeno (proacrosina), el que se convierte en la enzima activa en su liberación durante la reacción acrosómica. La hialuronidasa digiere la matriz intercelular de ácido hialurónico que mantiene unidas a las células de la granulosa (cúmulo), por lo que permite a los espermatozoides pasar a la ZP (Zona Pelucida). Si se agregan inhibidores de la hialuronidasa a los ovocitos y espermatozoides capacitados, la penetración a través de las células del cúmulo no se produce. La proenzima proteolítica proacrosina, es

activada para producir acrosina, la que digiere un área a través de la ZP (Zona Pelucida) por la cual pasan los espermatozoides ayudados por la propulsión hacia el frente de la cola activada (Hafez y Hafez, 2000).

2.5.12. Evaluación de la fertilización

En general, se considera fertilizado a aquel ovocito que ha emitido el segundo corpúsculo polar y se visualizan los pronúcleos masculino y femenino y la cola espermática (Del Campo, 1993).

Sin embargo, no siempre es posible la visualización de todas las estructuras y se propone la formación de las primeras blastómeras como criterio (Shioya *et al.*, 1988; Fukui y Ono, 1989; Fukui, 1990).

2.6. Antecedentes de trabajos de fertilización *in vitro* en camélidos

Un trabajo inicial fue realizado por Del Campo (1994), donde diseñó un estudio para determinar la viabilidad de desarrollar sistemas de maduración, fertilización y cultivo *in vitro* utilizando ovocitos foliculares y espermatozoides epididimarios recolectados de llamas en el momento del sacrificio. De un total de 1324 complejos de ovocitos del cúmulo (AOC) recuperados, 972 se cultivaron en gotas de 50 uL de medio TCM-199 con 10% de suero de buey inactivado por calor (DBS) y hormonas durante 30 h. Después de la maduración, los ovocitos se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos en un diseño factorial de 2×2 : ovocitos encerrados en cúmulos, 2 ug / ml de heparina (Grupo 1); ovocitos encerrados en cúmulos, 5 ug / ml de heparina (Grupo 2); ovocitos desnudos, 2 ug / mL de heparina (Grupo 3); y ovocitos desnudos, 5 ug / ml de heparina (Grupo 4). Se

obtuvieron ovocitos desprovistos para los grupos 3 y 4 mediante agitación vorticial. Los epidídimos también se recogieron en el matadero y los espermatozoides frescos (para cada réplica) se obtuvieron picando el epidídimo caudal con una hoja de bisturí. Se inseminaron un total de 721 ovocitos con $2-3 \times 10^6$ espermatozoides epididimarios / mL en una gota de 50 μ L de medio FERT-TALP. Después de 18 h de inseminación *in vitro*, se colocaron 234 ovocitos en un co-cultivo de células epiteliales de la llama oviductal (LLOEC) en TCM-199 durante 9 d. Todos los cultivos se realizaron a 38,5 ° C bajo 5% de CO₂ en aire con alta humedad. La tasa de fertilización, la división inicial y el desarrollo en el co-cultivo se evaluaron y compararon. De 192 ovocitos examinados en busca de signos de fertilización, 56 (29.2%) fueron penetrados por espermatozoides con 57.1% (3256) de los ovocitos penetrados que tenían pronúcleo masculino y femenino. No hubo diferencias entre los grupos de tratamiento en la fertilización total. Sin embargo, la frecuencia de ovocitos fertilizados normalmente tendió a ser mayor en los ovocitos desnudos 67.7% (2131) que los ovocitos inseminados con células del cúmulo 44.0% (1125) independientemente de la concentración de heparina ($P < 0.06$). La tasa de desarrollo embrionario total a las 2 células al estadio de blastocisto fue del 32,1% (75234). No hubo diferencia en la tasa de desarrollo entre los grupos. De los 234 ovocitos co-cultivados en LLOEC durante 9 días, 15.8% se desarrollaron en 2 a 16 células, 5.6% en mórulas, 6.0% en blastocitos tempranos / expandidos y 4.7% en blastocistos de eclosión / eclosión. Los resultados indican que es posible un sistema de fertilización *in vitro* en la

llama utilizando material de matadero y que los ovocitos de llama se pueden fertilizar en presencia de heparina y espermatozoides epididimarios.

Arriaga (2014), evaluó el efecto de la temperatura (12-15 y 22-25 °C) y el tiempo de almacenamiento (0 y 16 horas) de ovarios de alpacas sobre la tasa de maduración y división pos-fecundación *in vitro*. Los ovarios fueron recolectados de alpacas adultas sacrificadas en el camal de Pilpichaca (Huancavelica, Perú) y transportados al laboratorio en solución salina al 0.9% con una temperatura inicial de 35 °C. Los ovarios fueron distribuidos al azar en los tratamientos Control (0 h), T1 (16 h a 12-15 °C) y T2 (16 h a 22-25 °C). Los ovocitos se obtuvieron por disección, seleccionándose aquellos con una o más capas de cúmulos, y madurados en medio TCM 199 por 40 h bajo condiciones de 5% CO₂ y 39 °C. Parte de los ovocitos (172) fueron fijados y teñidos para evaluar el estadio de maduración nuclear y los restantes (440) fueron co-cultivados por 18 h con espermatozoides obtenidos de epidídimos. Posteriormente, los presuntos cigotos fueron colocados en medio de cultivo KSOM por 72 horas pos-fecundación *in vitro* y luego transferidos a medio SOF. Se obtuvo una tasa de maduración nuclear en metafase II de 47.9, 12.2 y 32.7%, una tasa de división de 46.2, 8.1 y 32.7% y una tasa de blastocistos de 33.3, 14.2 y 20.6% para los grupos Control, T1 y T2, respectivamente ($p < 0.05$, excepto entre la tasa de blastocistos del T1 y T2). Los resultados sugieren que el almacenamiento de ovarios de alpaca a 22-25 °C por 16 h (T2) permite mantener la calidad de los ovocitos y obtener una mayor tasa de maduración y de división posfecundación *in vitro*.

Por otro lado Huanca (2014), evaluó el efecto del tiempo de cultivo sobre la tasa de maduración nuclear y tasa de división posfecundación a 72 horas de ovocitos de alpacas. Complejos Cumulus - Ovocitos (CCOs) fueron obtenidos de ovarios procedentes de animales beneficiados en el camal y transportados a 35 °C en solución salina 0.9% suplementada con antibiótico antimicótico. Los CCOs fueron aspirados de folículos de 2 a 6 mm.

Experimento 1: 502 ovocitos fueron distribuidos en cuatro tiempos de maduración (30, 34, 38 y 42 horas) y madurados en TCM-199 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. Posteriormente, los ovocitos fueron removidos, lavados con PBS suplementado con 10% de SFB y 1 mg/ml de hialuronidasa y fijados en solución de etanol y ácido acético (3:1). Los ovocitos fueron colocados en portaobjetos, teñidos con 1% de orceína y examinados bajo un microscopio a 400x para determinar la maduración nuclear.

Experimento 2: 533 ovocitos fueron cultivados bajo las mismas condiciones del experimento 1 y fecundados con espermatozoides obtenidos de epidídimos. Los espermatozoides fueron centrifugados a 700 rpm en un gradiente de Percoll discontinua (22.5/ 45%) por 25 minutos. El sobrenadante fue removido y el pellet (con espermatozoides viables) reconstituido con TL-Stock. Los gametos fueron co-cultivados por 18 horas a 39 °C con 5% de CO₂ en KSOM suplementado con 10% de SFB, 2 mM de piruvato de sodio y 50 µg/mL gentamicina, y evaluados a las 72 horas. En el experimento 1 se obtuvo el 26.3 ± 5.4, 52.6 ± 6.7, 68.5 ± 10.6 y 75.3±11.9% de ovocitos

en Metafase-II para 30, 34, 38 y 42 h de cultivo, respectivamente, con diferencia estadística entre 30 y 34 h respecto a 38 y 42 h ($p < 0.05$). En el experimento 2, la tasa de división fue 9.5 ± 4.8 , 8.1 ± 5.8 , 15.6 ± 9.2 y 19.8 ± 8.0 % para 30, 34, 38 y 42 h, sin diferencia estadística entre grupos. Los resultados de Huanca sugieren que los ovocitos de alpacas requieren de 38 a 42 h de maduración para obtener estadios de Metafase-II.

Mamani (2015), desarrollo un trabajo con objetivo es evaluar el efecto de los métodos de selección espermática swim-up y washing sobre la tasa de fecundación in vitro de ovocitos de alpacas. Espermatozoides fueron obtenidos por slicing de cuerpos y colas de epidídimo de alpacas sacrificadas/beneficiadas ($n=7$), congelados en nitrógeno líquido y, una vez descongelados se evaluó motilidad progresiva (25 ± 5.96 %), vitalidad (32 ± 5.57 %) y concentración espermática ($66.5 \pm 24.4 \times 10^6$ espermatozoides ml^{-1}), enseguida seleccionados mediante swim-up se obtuvo 18 ± 6.78 , 22 ± 8.58 y $13.5 \times 10^6 \pm 11.0 \times 10^6 \text{mL}^{-1}$ de motilidad progresiva, vitalidad y concentración espermática respectivamente, frente a $23\% \pm 4.83$, $29\% \pm 8.30$ y $52.0 \times 10^6 \pm 28.3 \times 10^6 \text{mL}^{-1}$ de motilidad progresiva, vitalidad y concentración espermática respectivamente, obtenido por washing; ambos mostraron similares características de motilidad progresiva y vitalidad ($p > 0,05$), pero el método washing proveyó mayor concentración espermática respecto a swim-up. De 335 ovarios de alpacas sacrificadas/beneficiadas, 839 complejo cúmulus-ovocito (COC) de grado I y II, se utilizaron en 13 sesiones de fecundación in vitro. Los COC fueron madurados en medio de maduración (27 horas con 5% de CO_2 y 38.5°C en gotas de $50 \mu\text{L}$ con 10

COC/gota), desnudados parcialmente por pipeteo suave y colocados en 45 μL de medio de fecundación; exponiéndolos luego a una concentración final de 397 y 484 x 10³ espermatozoides motiles ml^{-1} para swim-up y washing respectivamente (sin agente capacitante), co-incubados por 72 horas y evaluados solo tasa de segmentación. Se observó 35% (147/418) de segmentación para swim-up frente a 37% (155/421) para washing, no habiendo diferencia significativa ($p > 0,05$), es decir, ambos métodos pueden ser usados en procesos de fecundación in vitro sin perjudicar la tasa de fecundación.

III. MATERIALES 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"latitud Sur y 70°01'07.3"longitud Oeste, con una temperatura ambiental en el 2017 que oscilo de -2 a 20 °C y una humedad relativa que varía entre 36 a 55%. (SENAMHI, 2017).

3.2. Material de estudio

3.2.1. Material biológico

- a) **Ovocitos:** Para la obtención de ovocitos y fluido folicular se aspiraron ovarios de alpacas de raza Huacaya beneficiadas.

Tabla 2: Distribución de ovocitos para maduración (evaluación de corpúsculo polar) según tratamientos.

T1	T2	T3 control
50	50	50

T1= FFp (Fluido de folículos pequeños), T2= FFg (Fluido de folículos grandes), T3= TCM-199

Tabla 3: Distribución de ovocitos para fertilización in vitro por tratamientos.

T1	T2	T3 control
189	173	170

T1= FFp (Fluido de folículos pequeños), T2= FFg (Fluido de folículos grandes), T3= TCM-199

- b) **Espermatozoides del conducto deferente:** Se colectaron espermatozoides de 2 alpacas Huacaya adultos procedentes del Centro de Investigación y Producción -La Raya, que previamente

fueron sometidos a cirugía de desviación del conducto deferente, y que fueron mantenidos en la ciudad universitaria.

3.2.2. Equipos de laboratorio

- Baño maría
- Cámara de flujo laminar
- Vortex
- Centrifuga
- Congeladora
- Refrigeradora
- Balanza analítica
- Platina calentadora
- Microscopio estereoscópico
- Microscopio invertido
- Bomba de CO₂
- Estufa
- Micro dispensador de 10 µL
- Termómetro

3.2.3. Materiales de laboratorio

a) Materiales para producción y manejo de embriones:

- Jeringas de tuberculina
- Jeringas de 5, 10, 20 y 60 mL.
- Tips de 10 µL,
- Placas Petri de 2 pocillos
- Cámara portátil (taper)

- Agujas hipodérmicas de 20 G x 1, 23 G x 1
- Papel filtro de 125 μm
- Filtros de poro de 22 μm
- Tubos de ensayo
- Tubos Falcón
- Probetas graduadas de 100 mL
- Porta y cubre objetos
- Guantes de nitrilo, barbijo y gorra de bioseguridad.

b) Reactivos:

- Medio de cultivo tisular TCM-199 (Medium 199 – M2520 - 1L SIGMA ®)
- Suero fisiológico
- Agua bi destilada
- Bicarbonato de sodio (Sal de Andrews ®)
- Solución medio stock tyrode lactato modificado SPERM-TALP (anexo C)
- Solución medio stock tyrode lactato modificado FERT-TALP (anexo C)

3.3. Metodología

3.3.1. Colección de ovarios, ovocitos y maduración,

a) Transporte de ovarios

Los ovarios de alpacas huacaya beneficiadas, fueron colectados en mataderos domiciliarios de la ciudad de Nuñoa- Melgar- Puno.

Los ovarios fueron transportados hacia el laboratorio de Reproducción Animal de la FMVZ, dentro de en bolsas de polietileno que contenían solución salina (0.9% NaCl) + antibióticos (100 U.I. /mL de penicilina + 1 mg/mL de estreptomina), dentro de un termo con agua caliente de 30 a 35°C, por un lapso no mayor a 4 horas.

b) Aspiración de ovocitos

En el laboratorio los ovarios fueron lavados 2 veces con suero fisiológico temperado a 35°C y secados con papel toalla, para posteriormente ser fijados a nivel del hilo con una pinza hemostática Kelly y proceder con la aspiración de los ovocitos, el cual se realizó por punción de los folículos visibles en la superficie ovárica de medidas 2 a 5 mm con ayuda 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).

El contenido de la aspiración (fluido folicular + ovocitos) fue vertido a un tubo de ensayo de 10 mL de capacidad dentro de un baño María a 37°C, dejando sedimentar por 20 minutos para que se sedimenten los ovocitos en el fondo del tubo.

Seguidamente se extrajo el sobrenadante con ayuda de una jeringa adosada a un tip de punta larga.

El sedimento se vertió en una placa Petri (35 x 10mm), y se procedió a enjuagar el tubo con 2 mL de PBS + 10% Suero Fetal Bovino (SFB), se dejó en reposo 2 a 3 min, para luego continuar con la búsqueda de ovocitos con ayuda de un microscopio estereoscopio a un aumento de 25 X, todo este procedimiento sobre una platina temperada a 38°C.

Con ayuda de un tip adosado a una jeringa de tuberculina se cargaron cuidadosamente los ovocitos para trasladarlos a otra placa petri que contenía 3 mL de PBS + 10% SFB para realizar la evaluación y selección de los ovocitos.

c) Clasificación de los ovocitos

Los ovocitos se clasificaron teniendo en cuenta el número de capas de células del cumulus y la apariencia del citoplasma, categorización empleada por Gordon. (2007), siendo la siguiente: Categoría A = Presentan más de tres capas compactas de células del cúmulus que los rodean en toda su superficie; Categoría B= presentan tres capas compactas de células del cúmulus.

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

d) Preparación del fluido folicular

Se aspiró el fluido folicular de folículos de diámetro entre 2 a 5 mm (T1= Folículos pequeños) y folículos pre-ovulatorios de 7 a 12 mm (T2= Folículos grandes).

El contenido se colocó en tubos de ensayo centrifugándose a 3000 rpm por 30 min.

El fluido centrifugado (sobrenadante) se separó en volúmenes de 0.5 mL en viales y se conservó en un congelador a -38.5°C hasta un máximo de 4 semanas.

e) Maduración in vitro

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

El medio de maduración fue preparado de la siguiente manera:

Tratamiento 1: 1 mL de fluido de folículos pequeños + 2 UI de eCG + 10 UI hCG + 5% SFB+ 5 μL de heparina +10 uL de antibiótico (ATB)

Tratamiento 2: 1 mL de Fluido de folículos grandes + 2 UI de eCG + 10 UI hCG + 5% SFB+ 5 μL de heparina +10 uL de ATB

Tratamiento 3 (control): 1 mL de TCM-199 + 2 UI de eCG + 10 UI hCG + 5% SFB + 5 μL de heparina +10 uL de ATB

Los componente del medio de maduración se homogenizaron y colocándose en gotas de 0.5 mL en una placa petri (9x5x1cm) de 2

pocillos cubiertos con aceite mineral, estos se incubaron por una hora para su equilibración.

La incubación se realizó de acuerdo al protocolo de Suzuki *et al.* (1999), con ligeras variaciones y adecuaciones que a continuación se detallan:

Dentro de una caja de plástico (taper) con medidas (largo= 16cm, ancho=11cm, alto= 5.8 cm), y con un volumen de 500 cm³, se acondiciono en la tapa una válvula de conexión y con control para evitar la salida del contenido gaseoso.

Para la adición de CO₂ dentro el taper y a la altura de la válvula se colocó un dispositivo de plástico (diámetro= 35 mm y alto= 20 mm), dentro de este se colocó 0.21 g de gránulos efervescentes de bicarbonato de sodio y sulfato de magnesio desecado (Sal de Andrews®), a través de la válvula se adicionó 5 mL de agua destilada sobre los gránulos efervescentes para la liberación de CO₂ en el interior del taper, el cual desprende aproximadamente 5% de CO₂.

Asegurando el táper y la válvula se colocó en baño maría convencional a 38.5°C por 36 horas para su correspondiente maduración.

3.3.2. Evaluación de maduración ovocitaria

Los ovocitos madurados después de 36 horas de incubación, fueron extraídos a gotas de mPBS+10% de suero fetal para ser lavados y evaluados.

Para la evaluación se tomó en cuenta el grado de expansión de las células a nivel de cumulus del ovocito mediante el microscopio estereoscopio a un aumento de 25 X y a la aspiración la elasticidad del cumulus ophorus.

Para ratificar la maduración 50 ovocitos por tratamiento fueron desnudados, colocando en un tubo cónico de vidrio de 12 mL de capacidad 0.5 mL de mPBS mas los ovocitos, el contenido fue vortezado a 10 000 rpm por 45 segundos.

El contenido del tubo vortezado se vertió sobre una placa petri que contenía 3 mL de mPBS+10% de suero fetal y bajo la lupa de un microscopio estereoscopio a 25X y luego a 40X en un microscopio invertido para contabilizar los ovocitos maduros según la presencia del primer corpúsculo polar.

3.3.3. Fertilización in vitro

a) Colección, preparación y capacitación de espermatozoides.

Se utilizaron dos machos con desviación de los conductos deferentes (Pérez *et al.*, 2006). Para la colección de los espermatozoides se colocaron a los machos en posición decúbito lateral, sujetados con ayuda de personal auxiliar. La colección de espermatozoides se realizó de acuerdo a lo descrito (Pérez *et al.*, 2006), con la variación que el medio de colección fue 1 mL de solución de tiroides modificado SPERM TALP; (Parrish *et al.*, 1988), lo que constituye la preparación de los espermatozoides para el inicio de la capacitación, este medio de 1 mL más los espermatozoides se les aplico el swim up (selección

de espermatozoides vivos que sobre nadan en la superficie del medio), mezcla que se llevó a baño maría por 1 h a 38.5°C, con 5% de CO₂ y alta humedad (tubo sellado más la adición 5% de CO₂). La concentración aproximada de los espermatozoides se ajustó a 5×10^6 de espermatozoides/mL (Conde *et al.*, 2008), tomando en cuenta la motilidad total >50%.

b) Fertilización in vitro.

Se prepararon gotas de 0.5 mL del medio de fertilización con FERT TALP en placas petri (9x5x1cm) que se cubrieron con aceite mineral y se colocaron dentro del táper y está a la vez dentro de baño maría para su equilibración por 2 horas.

Los ovocitos maduros se lavaron tres veces en gotas de FERT TALP equilibrados, para ser finalmente colocadas al medio de fertilización de 0.5 mL, medio donde se juntaron ovocitos + 5 µL de espermatozoides capacitados; por último se adiciono 20 µL por pocillo de la combinación de penicilamina, epinefrina e hipotaurina.

La placa petri que contiene la gota de ovocitos maduros + espermatozoides se colocaron nuevamente dentro del taper y está a la vez dentro de baño maría por espacio de 18 horas para su fertilización (los gránulos efervescentes proporcionaran el CO₂ correspondiente).

3.3.4. Evaluación de fertilización

Previamente los presuntos cigotos después de la fertilización fueron cambiados, dentro de gotas de 0.5 mL de medio de cultivo compuesto de TCM-199 bufferado más el 10% de suero fetal por espacio de 24 y 48 horas más, cubiertos con aceite mineral e incubados (incubadora portátil de CO₂).

Para la evaluación de la fertilización los presuntos cigotos fueron desnudados por aspiraciones repetidas para su reconocimiento como cigotos. Luego se trasladaron estos cigotos a una placa petri que contenía 3 mL de mPBS+10% de suero fetal y bajo la lupa de un microscopio esterescopio a 25X y luego a 100X se contabilizó los cigotos por la presencia de la división celular (observando el pronúcleo masculino y pronúcleo femenino), y se determinó el porcentaje de ovocitos fertilizados.

3.4. Método estadístico.

Las variables de estudio (maduración y fertilización), se analizaron por la prueba de Chi-cuadrado dentro una tabla de contingencia.

Siendo la ecuación siguiente:

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

Dónde:

θ_i = Frecuencia observada.

e_i = Frecuencia esperada.

k = Numero de columnas.

r = Numero de filas.

Para el análisis de la variable expansión y viscoelasticidad se utilizó un Diseño completo al azar y una prueba de comparación múltiple de Tukey, cuyo modelo es:

$$X_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

$i = 1, 2, 3$, tratamientos

$j = 1, 2, 3, 4, 5, 6$ repeticiones

Donde:

X_{ij} =Variable de respuesta

μ =Promedio general del experimento

T_i =Efecto de los medios de maduración

E_{ij} =Efecto del error experimental

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Maduración *in vitro* de ovocitos

4.1.1. Expansión y visco-elasticidad

Para evaluar la maduración de los ovocitos primeramente se observó la expansión y visco-elasticidad de la células del cumulus ophorus, que rodean al ovocito, calificación que se realiza en forma subjetiva en la escala de 0 a 3, que describe (Avery *et al.* 2003).

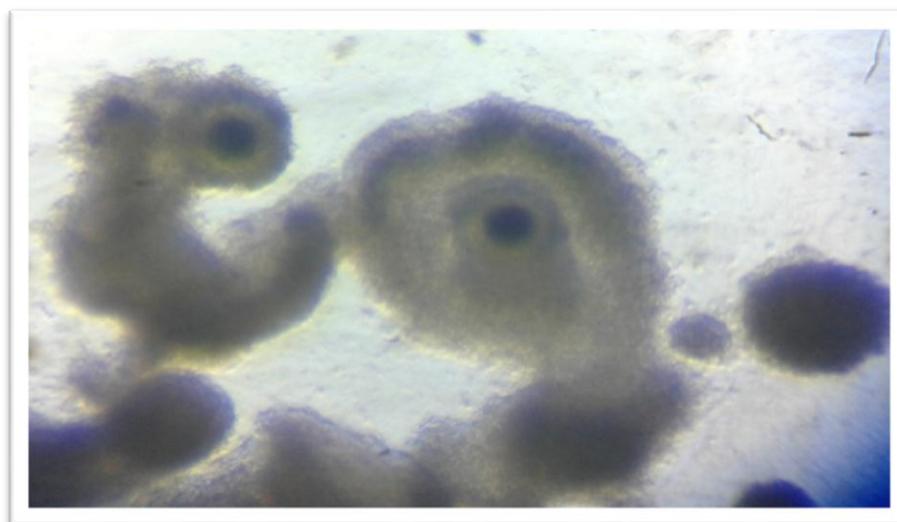


Figura 1: Expansión de las células del cumulus grado 3

En el presente estudio estos parámetros se evaluaron a las 36 h de cultivo estando todavía los ovocitos dentro la placa de maduración donde se dio la valoración de expansión y visco-elasticidad de 2,35 ; 2,73 y 2,23 para el primer, segundo y tercer (control) tratamiento respectivamente, estos datos sometidos al ANVA muestran que existe diferencia estadística ($p < 0.05$), siendo superior en el tratamiento T2 (Tabla 2) donde se utilizó fluido de folículos pre-ovulatorios esto posiblemente se debería a que en este fluido la concentración de los factores de maduración como el estradiol estudiado en alpacas por

Lázaro (2016), encontró que tiene 234 y 566 ng/mL en folículos dominantes mientras que en folículos en crecimiento 13.2 ± 11.3 ng/mL, otro factor de maduración es la LH que en folículos pre-ovulatorios es mayor, hormonas que mejoran el grado de expansión, además de ello resaltando al segundo tratamiento el coeficiente de variabilidad es 7.20 %, estadístico que indica homogeneidad en los datos, no siendo así para el primer tratamiento donde los resultados son similares al tratamiento control y también encontrándose coeficientes de variabilidad ligeramente altos.

Tabla 4: Grado de expansión y visco-elasticidad de las células del cumulus.

Tratamiento	Número de replicas	Promedio	Coefficiente de variabilidad %
T1	6	2.35 ^a	13.38
T2	6	2.73 ^b	7.20
T3	6	2.23 ^a	12.17

P<0.05

T1: Fluido de folículos pequeños más gonadotropinas T2: Fluido de folículos grandes más gonadotropinas y T3: Tratamiento control.

La literatura no reporta resultados de expansión y visco-elasticidad de las células del cumulus ophorus que rodean al ovocito maduro en camélidos, pero resultados de expansión y visco-elasticidad en vacunos fueron descritos por Chasombat *et al.* (2013) donde reporta el grado 3 (100% de expansión), grado 2 (50% de expansión), grado 1 (< al 10%) proporciones que se correlacionan con la madurez del ovocito. Utilizando estos parámetros en las células del cumulus que

rodean a los ovocitos de alpacas difieren observándose que además de expandirse las células, se desprenden del presunto ovocito maduro. La explicación de la expansión de las células de cumulus es debido a la acción de la oleadas de LH responsables de ovulación, que rompen los puentes celulares de las células de la corona radiata y cumulus que penetran al citoplasma del ovocito (Schillo, 2009) y la visco-elasticidad está dada por la acción de la LH sobre las células del cumulus que cambien el perfil bioquímico haciendo secretar enzimas como la colagenasa (Gordon, 2003). Estas dos acciones determinan la expansión y visco-elasticidad en las células del cumulus ophorus (COCs), que sirven de parámetros para indicar el grado de maduración del ovocito. En el presente estudio la diferencia de expansión y visco-elasticidad en los ovocitos del tratamiento 2 fue mayor y casi cercano a la calificación de 3 en vacunos, lo que se debería a que el fluido de folículos pre-ovulatorios que sirvió de medio de maduración de los ovocitos, con mayor cantidad de LH producto por el mayor número receptores que tuvieron para esta hormona. Además la acción de las hormonas exógenas que se les adicionó a los tratamientos y en este caso estas hormonas potenciaron para este resultado en el tratamiento 2.

Mientras que en el tratamiento 1 el efecto de los componentes del fluido folicular (folículos pequeños) habrían actuado en menor magnitud, obteniéndose resultados de expansión y visco-elasticidad menor.

4.1.2. Evaluación de maduración por presencia del primer corpúsculo polar

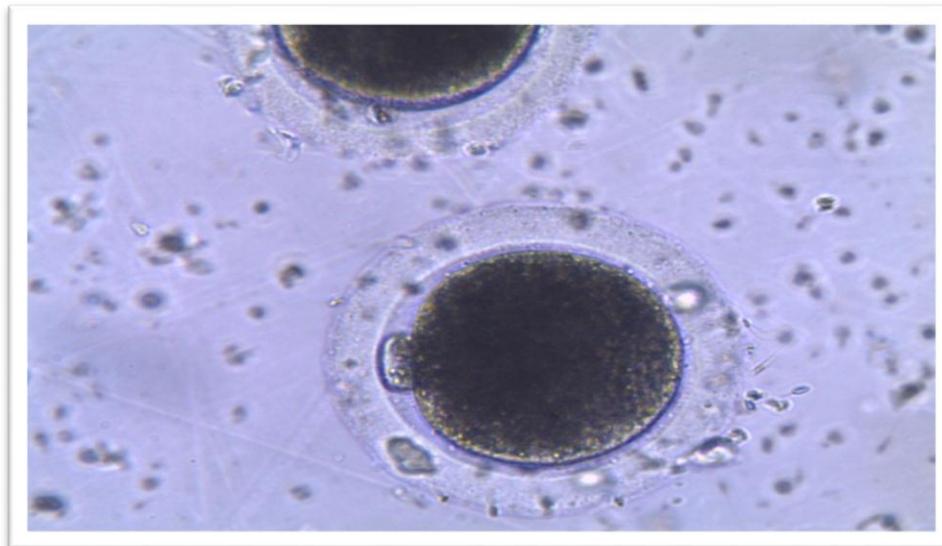


Figura 2: Ovocito de alpaca con extrusión del primer corpúsculo polar

Para determinar la maduración del ovocito por la presencia del corpúsculo polar previamente los ovocitos fueron desnudados de las células del cumulus ophurus (COCs) por vorterización.

Contabilizándose los ovocitos que tenían corpúsculo polar se obtuvo el 58% (29/50) para el primer tratamiento, 67% (34/50) para el segundo tratamiento y 54% (27/50) para el tratamiento control. Resultados sometidos a la prueba estadística de Ji-cuadrado no mostraron dependencia ($p > 0.05$), siendo el efecto del FFg el que resalta, superando al T2 de FFp en 9%, mientras que al tratamiento control supera en 13%, porcentajes no suficientes para mostrar influencia del medio de maduración a la variable dependiente maduración por presencia del primer corpúsculo polar.

Tabla 5: Maduración in vitro por presencia del primer corpúsculo polar (%)

Tratamiento Condición	T1		T2		T3	
	Maduro	29	58%	34	67%	27
No maduro	21	42%	16	33%	23	46%
Total	50	100%	50	100%	50	100%

P>0.05

T1: FFp Fluido de folículos pequeños, T2: FFg fluido de folículos grandes y T3: control

Resultados contrastados con los diferentes reportes por la presencia del primer corpúsculo polar, indica que finalizó la primera meiosis de la ovogénesis (ovulación) y que también se denomina en la metafase II determinado por tinción. Los resultados del presente trabajo son mayores a los de Arriaga *et al.* (2014) donde utilizó como medio de maduración TCM-199 suplementado con FSH por 40 h bajo condiciones de 5% de CO₂ y 39°C, en el que lograron el 47.9% de ovocitos en la metafase II, esto se debería al tiempo de transporte prolongado de 8 horas de los ovarios, cuando lo recomendado es de 2 a 6 horas (Gordon, 2003), pasado este tiempo el metabolismo del ovario se ve afectado por la falta de circulación sanguínea con la disminución del pH del licor folicular y por lo tanto la competencia del ovocito se ve afectado (Fukui *et al.*, 1987).

Huanca *et al.* (2014) lograron el 68.5% de ovocitos en metafase II después del cultivo por 38 h en medio de maduración TCM-199 suplementado con 10% SFB, resultados son ligeramente mayores al presente estudio, debido probablemente a que los autores en su medio de maduración suplementaron con hormonas como FSH y

estrógenos, utilizando una incubadora convencional. Mientras que en el presente estudio se realizó el cultivo en una incubadora portátil de CO₂ acondicionada, donde algunos factores afectaron como las glicoproteínas suplementadas al medio, en nuestro trabajo fueron la gonadotropina coriónica humana (hCG) y gonadotropina coriónica equina (eCG) que no son hormonas y su acción fue menos específica, también la humedad y la concentración de CO₂ no fueron controlados exactamente como en una incubadora convencional.

Un trabajo inicial que podría sustentar el por qué no existe influencia estadística entre el fluido de folículos grandes y pequeños es el reportado por Pacheco y Coila (2007), quien determinó la composición del fluido folicular de alpacas mediante la técnica de espectrofotometría, obteniendo resultados para: proteína total (g/dL) 8,26 y 7,26; albúmina (g/dL) 4,75 y 5,29; glucosa (g/L) 3,56 y 3,31; lípidos totales g/L) 0,3815 y 0,2775; colesterol (g/dL 0,1039 y 0,09375 en folículos secundarios (<7 mm) y terciarios (>7 mm) respectivamente, no existiendo diferencia estadística ($p > 0.05$), razón por la cual Pacheco y Coila (2007) recomienda el uso del fluido de folículos secundarios y terciarios en protocolos de maduración *in vitro*; en el presente trabajo también se utilizó fluido de medidas similares razón por la cual podemos inferir resultados que indicarían que la procedencia del fluido según tamaño de folículo no influye significativamente en la maduración por la composición que estas tiene, pero resaltando que los folículos de tamaño >7 mm poseen los valores más altos.

4.2. Fertilización *in vitro*

La fertilización de los ovocitos se determinó por la presencia de blastómeros después de las 72 horas post fertilización y cultivo respectivo (Tabla 6). Los resultados fueron 50.79% (96/189) para el primer tratamiento (T1), 53.765 (93/173) para el segundo tratamiento(T2) y 49.41% (84/170) para el grupo control (T3) respectivamente, estos resultados sometidos a la prueba de Ji-cuadrado no mostraron influencia del medio maduración en la fertilización ($p>0.05$), realizando un análisis del cuadro 6 se puede considerar que el porcentaje de diferencia entre tratamientos es similar ya que el T2 supera en apenas 3 y 4 % al T1 y T3 respectivamente, sin embargo la tendencia que ocurre en el cuadro 4 y 5 (maduración ovocitaria) siguen siendo constantes, resaltando siempre al T2 (Fluido de folículos pre-ovulatorios) como el tratamiento con mejores resultados.

Tabla 6: Tasas de fertilización por la presencia de blastómeros (%)

Tratamiento Condición	T1	T2	T3 (Control)
Fertilizado	96 50,79%	93 53,76%	84 49,41%
No fertilizado	93 49,21%	80 46,24%	86 50,59%
Total	189 100,00%	173 100,00%	170 100,00%

$p>0.05$

T1: FFp(Fluido de folículos pequeños), T2: FFg (fluido de folículos grandes) y T3: control

Los resultados de fertilización en el presente estudio son mayores a los reportados por Arriaga *et al.* de 46.2% (2014), donde utilizo previamente como medio de maduración TCM-199 y espermatozoides de la cola del epidídimo, a diferencia de nuestro trabajo donde se utilizó espermatozoides

del conducto deferente, además está el efecto del transporte de los ovarios, factor que influye en la maduración y consecuentemente en la fertilización. Así mismo los resultados de Huanca *et al.* (2014) lograron el 15.6 % de división a las 72 horas post fertilización, debido a que este autor utilizó como medio de fertilización KSOM (medio de optimización simple de potasio), el cual no da las condiciones para la capacitación de los espermatozoides y consecuente fertilización de los ovocitos.

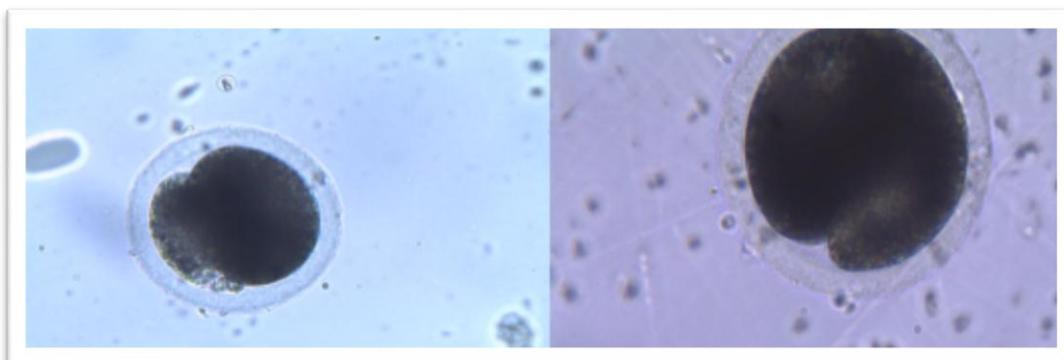


Figura 3: Cigotos a las 24 horas pos FIV

Los resultados del presente estudio que son de mayor proporción se debería a que los ovocitos fueron madurados en fluido folicular de diferentes tamaños de folículos más la adición de gonadotropinas. Así el fluido folicular viene a ser una sustancia nutricional para el ovocito (Choi *et al.*, 1998), la calidad del ovocito está afectado por las propiedades del fluido folicular (Iwata *et al.*, 2006). El fluido folicular es un suero de trasudación modificado por el metabolismo del folículo, conteniendo constituyentes específicos como esteroides y glicoproteínas sintetizadas por la pared del folículo. Durante el crecimiento folicular se establece un equilibrio entre el suero sanguíneo y fluido folicular, fluido folicular contiene varios componentes que se comportan como un buffer contra las influencias externas (Gordon, 2003).

A pesar que los fluidos foliculares de diferentes tamaños poseen diferentes componentes los fluidos de los folículos pequeños contienen factores de inhibición de la meiosis para maduración nuclear (Gordon, 2003), los componentes del fluido folicular de los folículos grandes o pre-ovulatorios pueden mejorar la secreción (de la células del cumulus) de algunos factores que promueven el temprano desarrollo de la capacidad de ovocitos, por lo tanto se infiere que los constituyentes del fluido folicular afecta la maduración del ovocito y promueve la meiosis (Coleman *et al.* 2007).

Las gonadotropinas como la FSH y LH contribuyen a los sistemas de cultivo de los ovocitos para la maduración, reanudando la meiosis en el ovocito que estaba detenido en el estado de profase en la primera meiosis (Schillo, 2009).

En vacunos Larocca *et al.*, (2004) utilizo TCM-199 como medio de maduración, suplementado con liquido folicular de folículos pre-ovulatorios >15mm (grupo 1) y de folículos de 5-7 mm (grupo 2) de diámetro más 5 % de SFB(suero fetal bovino), obteniendo resultados de tasa de división de 54.0 (259/480) y 54.0 (741/1371) para el grupo 1 y 2 respectivamente y que no presentan diferencia estadística ($p>0.05$), este reporte también contrasta y valida nuestro trabajo de investigación en cuanto a la influencia del fluido folicular en las tasa de división celular.

Los resultados obtenidos en fertilización en el presente trabajo ratifican los datos obtenidos en maduración *in vitro* (tabla 5), ya que el factor principal para obtener buenos resultados en fertilización es que los ovocitos lleguen

en metafase II y/o maduros al momento de la fertilización, razón por la cual los valores deben ser similares (Gordon, 2003).

V. CONCLUSIONES

El uso del fluido folicular suplementado más gonadotropinas como medio de maduración de ovocitos de alpacas es viable y su efecto en la fertilización es positivo.

El origen del fluido folicular según tamaño del folículo (pequeños y pre-ovulatorio) no muestran influencia ($p>0.05$) en la maduración según la proporción de ovocitos que presentan el primer corpúsculo polar, por lo tanto este resultado indicaría que la composición de los factores de maduración ovocitaria y componentes nutritivos no son determinantes.

La proporción en fertilización *in vitro* de ovocitos de alpacas madurados en fluido de folículos grandes y pequeños son similares, no existiendo dependencia entre las variables ($p>0.05$), este resultado ratifica los resultados de maduración.

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar el fluido folicular más la suplementación de gonadotropinas como medio de maduración en ovocitos de alpacas.

Se recomienda estudiar los componentes del fluido folicular y los mecanismos de acción en la maduración de ovocitos de alpacas.

Se recomienda que el tiempo de transporte de ovarios una vez beneficiados los animales sea el menor posible, ya que en tiempos prolongados ocasiona menores tasas de maduración y fertilización, que conducen al incremento del error de investigación.

Se recomienda a futuro desarrollar técnicas para la obtención de ovocitos de hembras vivas donantes, que permitiría tener una fuente de ovocitos en mayor número y por tiempo prolongado.

VII. REFERENCIAS

- Alvaro, F. (2003). *Producción Bovina de Carne*. Montevideo, Uruguay.: Departamento de Reproducción Animal Facultad de Veterinaria.
- Arlotto, T., Schwartz, J., First, N., & Leibfried, M. (1996). Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 45:943-956.
- 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 Ovocito. *RevInvVet Perú*, 25(4), 477-486.
- Avery, B., & Greve, T. (1995). Impact of percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology*, 44, 871-878.
- Avery, B., Strøbech, L., Jacobsen, T., Bøgh, I., & Greve, T. (2003). In vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes in undiluted follicular fluid: effect on nuclear maturation, pronucleus formation and embryo development. *Theriogenology*, 59(3-4):987-99.
- Barry, D., Rose-Hellekant, T., & Pinyopummintr, T. (1992). Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined media. *Theriogenology*, 37, No 1.
- Blondin, P., & Sirad, M. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 41(1):54-62.

- Brackett, B., Bousquet, D., Boice, M., Donawick, W., Evans, J., & Dressel, M. (1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology Reproduction*, 23:147-158.
- Brackett, B., Cofone, M., Boice, M., & Bousquet, D. (1983). Use of zona-free hamster ova to assess sperm fertility ability of bull and stallion. *Gamete Research*, 5:217-227.
- Chasombat, J., Nagai, T., Parnpai, R., & Vongpralub, T. (2013). Ovarian follicular dynamics, ovarian follicular growth, oocyte yield, in vitro embryo production and repeated oocyte pick up in thai native undergoing superstimulation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, Vol 26, Nro. 4: 488-500.
- Chian, R., Nakahara, H., Niwa, K., & Funahshi, M. (1992). Fertilization and early cleavage in vitro of ageing bovine oocytes after Inaduration in culture. *Theriogenology*, 67, 1053 –1059.
- Choi, Y., Takagi, M., & Kamshita, H. (1998). Developmental capacity of bovine oocytes matured in two kind of follicular fluid and fertilized in vitro. *Animal Reproduction Science*, 50(1998) 27-33.
- Coleman, N., Shagiakhmetova, G., Lebedeva, I., Kuzmina, T., & Golubev, A. (2007). In vitro and early developmental capacity of bovine oocytes cultured in pure follicular fluid and supplementation with follicular wall. *Theriogenology*, 67: 1053-1059.
- Conde, P., Herrera, C., Trasorras, V., Giuliano, S., Director, 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.

Del Campo, M. (1993). *Fertilización in vitro* (Vol. 1). Argentina: Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC).

Del Campo, M., Del Campo, C., Donoso, X., Berland, M., & Mapletoft, R. (1994). . In vitro fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology* , 41, 1219 –1229.

Díez, C., Muñoz, M., Cañamo, J., & Gómez, E. (2010). Biotecnologías reproductivas: Producción y Criopreservación de embriones in Vitro. *Tecnología agroalimentaria*, 41-46.

Francois, J., Michael, A., & Marc-Yré, S. (1997). Role of the cyclic Adenosine monophosphate-dependent protein kinase in the control of meiotic resumption in bovine oocytes cultured with thecal cell monolayers. *Biology of Reproduction*, 56: 1363.

Fukui, Y. (1990.). Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Molecular Reproduction and Development* , Vol. 26, 40-46.

Fukui, Y., & Ono, H. (1989). Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in-vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 86, 501-506.

- Fukui, Y., Imai, K., Noel, F., Alonso, F., & Ono, H. (1987). Follicle culture enhances fertilizability and clivage of bovine oocytes mutured in vitro. *Journal of Animal Science*, 64; 935-941.
- Gigli, I., Russo, A., & Agüero, A. (2006). Consideraciones sobre la Dinámica Ovárica en Equino, Bovino y Camélidos Sudamericanos. *Revista de la Facultad de Medicina Vetererinaria. Área de Theriogenología*, , Vol 8.
- Gordon, I. (1990). *In vitro maturation (IVM) and fertilization (IVF) of cante ova*. Embryo Transfer Newsletter.
- Gordon, I. (2003). *Laboratory production of cattle embryos* (2nd ed.). .: Cabi Publising Cambridge.
- Gordon, J. C. (1999). *Utilización de antisuero H-Y para sexar embriones bovinos en diferentes estadios del desarrollo embrionario, obtenidos por fertilización in vitro*. Cordova.: Universidad de Cordova. Facultad de Veterinaria.
- Greve, T., Madison, V., Avery, B., Callesen, H., & Hittel, P. (1993). In vitro production of bovine embryos. A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations. *Animal Reproduction Science*, 33:51-69.
- Griffin, E., & Ojeda, R. (1992). *Textbook of Endocrine Physiology* (2nd ed.). Oxford, New York: Oxoford University Press.
- Hafez, E., & Hafez, B. (2000). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales Domesticos* (Sexta ed.). Mexico: Interamericana Mc Graw-Hill.

- Herradón, P., Quintela, L., Becerra, J., Ruibal, S., & Fernández, M. (2007). Fecundación in vitro: Alternativa para la mejora Genética en Bovinos. XX Reunión ALPA, XXX Reunión APPA-Cusco-Perú, 34-41.
- Hillier, S. G., Smitz, J., & Eichenlaub-Ritter, U. (2010). Folliculogenesis and oogenesis: from basic science to the clinic. *Molecular Human Reproduction*, Vol 16(No.9), pp. 617–620.
- 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. *Revista de Investigaciones Veterinarias de Perú* , 25(4), 468-476.
- 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. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(4) 468-476.
- INEI. (2012). Instituto Nacional de Estadística e Informática. Resultados. Definitivos. IV Censo Nacional Agropecuario. Ministerio de Agricultura. Lima, Perú.
- IRAC. (2004.). *Fisiología de la reproducción de la vaca*. Cordova Argentina.
- Iwata, H., Inoue, J., kimura, K., Kuge, T., Kuwayama, T., & Monji, Y. (2006). Comparison between the characteristics of follicular fluid and developmental competence of bovine oocytes. *Animal Reproduction Science* , 91; 215-223.

- Iwata, H., Inoue, J., kimura, K., Kuge, T., Kuwayama, T., & Monji, Y. (2006). Comparison between the characteristics of follicular fluid and developmental competence of bovine oocytes. *Animal Reproduction Science* , 91; 215-223.
- Johnson, M., & Everitt, B. (1988). Capitulo 8: Coitus and Fertilization. En *Essential Reproduction* (pág. 198). Blackwel Scientific Pub.
- Larocca, C., Ivo, J., Lago, I., Roses, G., & Viqueira, M. (2004). Diferentes fuentes de Liquido folicular en el desarrollo in vitro de embriones bovinos. *Archivos de Zootecnia*, 329-332.
- Lázaro, M. Á. (2016). Relación entre los Estadios Foliculares y los Niveles de Estradiol Intrafolicular en Alpacas Vicugna pacos. *Tesis para optar el Título Profesional de: MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA*. Lima, Perú: UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA.
- Leibfried, M., Critser, E., Parrish, J., & Fist, N. (1989). In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 31: 6174.
- Lonergan, P., Vergos, E., Kinis, A., Sharif, H., & Gordon, I. (1991). The effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for IVM. *Theriogenology* , 35:231.
- Mamani, G. (2015). *Métodos de selección espermática y tasa de fecundación in vitro en ovocitos de alpaca*. Tesis de Maestría. Maestría en Producción animal. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Mozzaquatro, F., Rubin, M., Silva, C., Tessman, J., Rauber, L., Kurtz Filho, M., . . . Bunn, S. (2004). In vitro production of bovine embryos en medium

supplemented with defined and defined protein sources. *Archives of Veterinary Science*, vol 9(n. 1), 101-109.

Pacheco, J., & Coyla, P. .. (2010). Composicion del fluido folicular de alpacas (Vicugna pacos) en diferentes estadios de desarrollo. *Archivos de Zootecnia*, vol 59(n.227).

Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Leibfried-Rutledge, M. L., Crister, E. S., Eyestone, W. H., & First, N. L. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, Vol. 25, pp. 591-600.

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, H. (2017). Comparación de sistemas de cultivo de embriones de alpacas. *Rev. Investig. Altoandin.*, 157 - 164.

Risopatrón, J., Sánchez, R., Sepúlveda, N., Peña, P., Villagran, E., & Miska, W. (1996). Migration/sedimentation sperm selection method used in bovine in vitro fertilization: comparison with washing/centrifugation. *Theriogenology*, Vol. 46, pp. 65-73.

Ruiz, J. (2015). Estado de la Producción de Embriones in vitro en camélidos sudamericanos. *Spermova*, 5(2). 264-269.

- Salisbury, G., Van Demark, N., & Lodge, J. (1978). *Fisiología de la Reproducción e inseminación artificial de los Bóvidos* (Segunda ed.). Zaragoza, España: Acribia.
- Schillo, K. (2009). *The reproductive physiology of mammals: from farm to field and beyond*. EEUU.
- SENAMHI. (2017). Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología. Dirección Regional Puno. Perú.
- Shamsuddin, M., Larsson, B., & Rodríguez-Martínez, H. (1993). Maturation related changes in bovine oocytes under different culture conditions. *Animal Reproduction Science*, 31:49.
- Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S., & Hanada, A. (1988). In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. *Theriogenology*, Vol 30, pp. 489- 496.
- Stubbings, R. B., & Wosik, G. P. (1991). Glass wool versus swim-up separation of bovine spermatozoa for in vitro fertilization. *Theriogenology*, Vol 35 , pp. 276.
- 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.
- Tea, N. T., Jondet, M., & Scholler, R. (1983). Procéde disablement des spermatozoides mobiles de sperme humain per la méthode de migrationsédimentation. *Pathologie Biologie*, Vol 31, pp. 688-690.

- Thibodeux, J., Menezo, Y., Russel, J., Hansel, W., Goodeuax, L., Thompson, D., & Godke, R. (1992). Coculture of in vitro fertilized o embryos with oviduct epithelial cells origination from different stages of de estrus cycle. *Journal of Dairy Science*, 1448.1455.
- Tosti, E., Boni, R., & Cuomo, A. (2002). Fertilization and activation currents in bovine oocytes. *Reproduction*, 124, 835-846.
- Trasorras, V., & Miragaya, M. (2016). Factores que afectan el desarrollo de la fecundación in vitro en camélidos. *Spermova* , 6 (2) 104-106.
- .
- .

ANEXOS

Anexo A.

RESULTADOS DE MADURACIÓN Y FERTILIZACIÓN

Tabla 7: Resultados de tratamiento 1 fluido de folículos pequeños (2-4mm)

R	Fecha	N	Expansión	Fertilización	Evaluación - Día 1		Evaluación - Día 3		N Final	
			0-3	FECHA	NF	F	NF	F	NF	F
R1	21-03	24	2.5	25-03	-	9	10	14	10	14
R2	27-04	46	2.8	29-03	-	12	25	21	25	21
R3	04-05	19	2.5	06-05	-	5	8	11	8	11
R4	08-06	62	2.0	10-06	-	19	30	32	30	31
R5	29-06	17	2.0	31-06	-	5	9	8	9	8
R6	13-07	22	2.3	15-07	-	6	11	11	11	11
TOTAL									93	96

NF= no fertilizo, F=Fertilizado

Tabla 8: Resultados de tratamiento 2 fluido de folículos grandes (>7mm)

R	Fecha	N	Expansión	Fertilización	Evaluación -Día 1		Evaluación -Día 3		N Final	
			0-3		NF	F	NF	F	NF	F
R1	23-03	24	3.0	25-03	-	5	12	12	12	12
R2	30-03	26	2.8	01-04	-	7	12	14	12	14
R3	11-05	29	2.5	13-05	-	3	15	14	15	14
R4	18-05	44	2.8	20-05	-	12	18	18	18	18
R5	15-06	20	2.8	17-06	-	7	9	11	9	11
R6	29-06	40	2.5	01-07	-	8	14	24	14	24
TOTAL									80	93

NF= no fertilizo, F=Fertilizado

Tabla 9: Resultados de tratamiento 3 Control (TCM-199)

R	Fecha	N	Expansión	Fertilización	Evaluación -Día 1		Evaluación -Día 3		N Final	
			0-3		NF	F	NF	F	NF	F
R1	23-03	25	2.0	25-03	-	7	12	13	12	13
R2	30-03	35	2.5	01-04	-	6	14	21	14	21
R3	27-04	30	2.0	29-04	-	9	19	11	19	11
R4	18-05	37	2.8	20-05	-	10	18	19	18	19
R5	25-05	14	2.5	27-05	-	14	8	6	8	6
R6	29-06	29	2.0	01-07	-	7	15	14	15	14
TOTAL									86	84

NF= no fertilizo, F=Fertilizado

ANEXO B
PRUEBAS ESTADÍSTICAS

Tabla 10: Ji-cuadrado para comparar proporciones de ovocitos con presencia de primer corpúsculo polar.

Ovocitos maduros y no maduros					
Maduración	FFp		FFg		$\sum (\theta_i - ei)^2 / ei$
	θ_i	ei	θ_i	ei	
Sin corpúsculo polar	29	31.5	34	31.5	0.397
Con corpúsculo polar	21	18.5	16	18.5	0.676
Ji-Calculada					1.073
Ji-Tabular (p0.05)(1 GL)					3.840

P>0.05

Tabla 11: Ji-cuadrado para comparar proporciones de ovocitos fertilizados por división celular.

Ovocitos fertilizados y no fertilizados					
Maduración	FFp		FFg		$\sum (\theta_i - ei)^2 / ei$
	θ_i	ei	θ_i	ei	
Sin fertilizar	93	98.68	80	90.32	0.15
Fertilizado	96	90.32	93	82.68	1.65
Ji-Calculada					1.80
Ji-Tabular (p0.05)(1 GL)					3.840

p>0.05

Tabla 12: ANVA para evaluar media de expansión y elasticidad.

F de V	GL	SC	CM	F calculada	F tabular 0.05	F tabular 0.01
Trat.	2	0.78	0.391	5.51 *	3.68	6.36
E.E.	15	1.06	0.070			
Total	17	1.84				

p<0.05

Tabla 13: Estadísticos para expansión y elasticidad.

Tratamiento	N	Media	Desviación estándar	Coficiente de variabilidad
Total	18	2.444	0.3294	13.47 %

Tabla 14: Prueba de comparación múltiple de Tukey (0.05)

q(0.05, 3, 15)=3.67

Wt= 0.399

	T1	T2	T3
T1		-0.38	0.1
T2			0.48
T3			

T3	a
T1	a b
T2	b

ANEXO C

MEDIOS PARA MADURACIÓN Y FERTILIZACIÓN IN VITRO

1 PBS Buffer

Prepara la solución a partir de los reactivos siguientes y con pH 7.4 y la fórmula para 500 mL:

Agua ultra pura	400 mL
NaCl	4 g
KCl	0.1 g
Na ₂ HPO ₄	0.72 g
KH ₂ PO ₄	0.12 g
Aforar hasta	500 mL
Ajustar el pH 7.4 con HCl	
Conservar a 4 - 5°C	

2. PBSm – Medio de aspiración y lavado de ovocitos

Para preparar 50 mL

Mezclar:	
D-PBS (+) (Sol Stock)	48.50 ml
Gentamicina	50 ug/mL
SFB (suero fetal bov) (3%)	1.5 ml
Filtrar con poro de	0,22 μ.

3. TCM-199 – Medio de maduración

Preparar cada vez 10 mL de medio de maduración de la siguiente manera:

Para 10 mL de medio de maduración:

TCM-199 (c/sales de Earl, 0.25 Mm Hepes)	0.151 g
Piruvato de sodio	0.022 g
H ₂ CO ₃	0.022 g
Gentamicina	50 ug/mL
Suero de vaca celo (5%)	0.5 mL
eCG	2 U.I./mL
hCG	10 U.I./mL
Filtrar (0.22 μ)	
Ajustar el pH de 7.2 a 7.4.	

4. MEDIO DE FERTILIZACION**MEDIO STOCK TYRODE LACTATO MODIFICADO SPERM-TALP**

Compuesto	Final mM	/100 mL
NaCl	100	584 mg
KCl	3.1	23 mg
NaHCO ₃	25.0	210 mg
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.3	4 mg
Hepes	10.0	238 mg
Gentamicina	25 ug/mL	100 uL
Lactato de sodio (60%)	21.6 uL	368 uL
Rojo fenol (1%)	1 uL/mL	100 uL

Agregar estos dos componentes al final, agitando suavemente la solución

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

Ajustar: El pH a 7.4

Osmolaridad y ajustar a 290-300 mOsm

Filtrar: con filtros de 0.22 um

conservar a: 4 °C en frascos estériles por dos semanas.

Sperm-Talp solución de trabajo

El día de su uso preparar

	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

Filtrar: con filtro de 0.22 um

MEDIO STOCK TYRODE LACTATO MODIFICADO FERT-TALP

FERT-TALP	Final mM	50 mL
NaCl	114	333.00 mg
KCl	3.2	11.75 mg
NaHCO ₃	25.0	105.2 mg
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.4	2.76 mg
Gentamicina	25 ug/mL	1225 ug
Rojo fenol (1%)	1 uL/mL	50 uL

Agregar estos dos componentes al final, agitando suavemente la solución

CaCl ₂ .2H ₂ O	2.0	15 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.5	5 mg

Determinar: El pH y ajustar a 7.

Osmolaridad y ajustara a 290-300 mOsm

Filtrar: con filtros de 0.22 um

Conservar a: 4°C en frascos estériles por dos semanas.

Fert-Talp solución de trabajo

El día de su uso se prepara:

Cantidad/mL	1mL	5 mL
-Talp (stock)		
BSA Fraccion V	6mg/mL	30 mg
Piruvato de sodio (stock)	10 uL/mL	50 uL
Gentamicina	25 ug/mL	125 ug
Filtrar: con filtro de 0.22 um		

ANEXO D
FIGURAS



Figura 5: Colección de ovarios de alpacas Huacaya (Nuñoa- Melgar)



Figura 4: Transporte de ovarios (0.9% NaCl + ABT) a 35 °C



Figura 6: Medición de ovarios para tipificación según tratamientos (Fluido de folículos pequeños y grandes)



Figura 8: Lavado de ovarios (NaCl 0.9%)



Figura 7: Aspiración de FF y COCs



Figura 10: Centrifugado de FF a 3500 g. por 30 minutos



Figura 9: Fluido folicular centrifugado

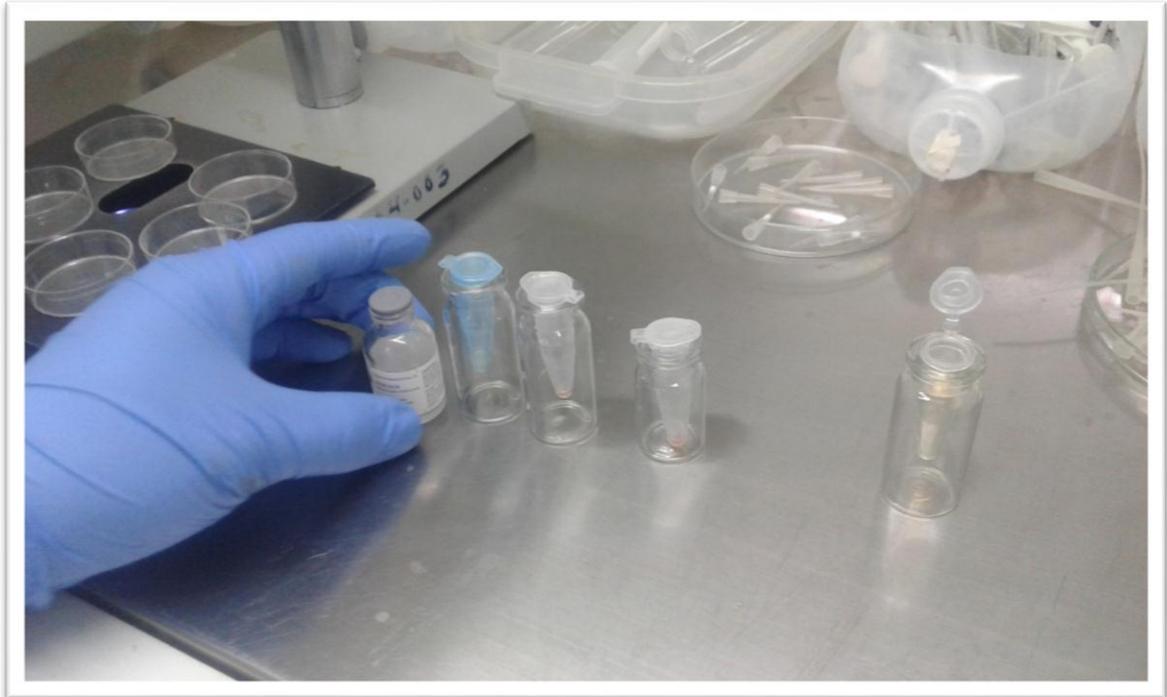


Figura 11: Preparación de medio de maduración (1 mL FF+ 10 uL ABT+ eCG + hCG + heparina)



Figura 12: Colección de espermatozoides del conducto deferente.

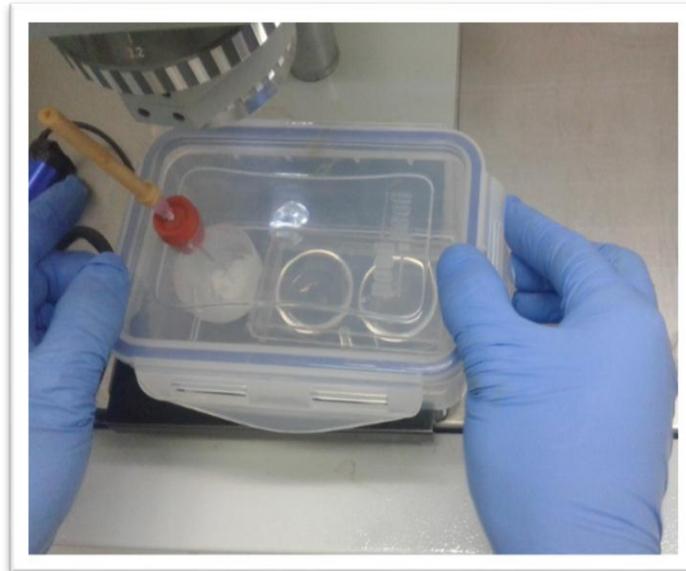


Figura 13: Cámara portátil de CO₂

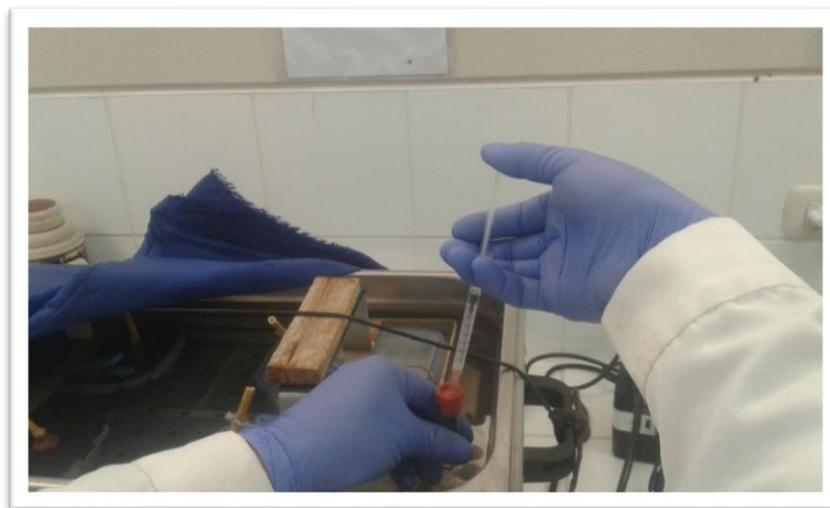


Figura 14: Swim up de espermatozoides de alpaca

ANEXO E

GLOSARIO DE TÉRMINOS UTILIZADOS EN REPRODUCCIÓN

Acrosoma: Corpúsculo parecido a un sombrero, rico en enzimas, que rodea la mitad anterior de la cabeza de un espermatozoide. Su activación (reacción acrosómica) tiene un papel fundamental en el proceso de fertilización fisiológica del ovocito.

ADN (ácido desoxirribonucleico): Material genético localizado en el núcleo de las células responsable de la transmisión de las características hereditarias (fenotipo y genotipo).

Alelo: Cada una de las formas en que puede presentarse un gen en un determinado locus de cromosomas homólogos.

Andrógenos: grupo de hormonas sexuales masculinas. Los andrógenos también son producidos en pequeñas cantidades por los ovarios y la corteza adrenal de las hembras. Los más frecuentes son: testosterona, androstenediona, dihidroepiandrosterona (DHEA) y dihidrotestosterona.

Andrología: Especialidad médica que trata los desórdenes del sistema reproductor masculino, fundamentalmente la infertilidad y las disfunciones sexuales.

Aneuploide: célula o individuo con un número de cromosomas que no es múltiplo exacto del número haploide. Los ejemplos más frecuentes son las trisomías o monosomías.

Anidación: conocida también como nidación. Es la implantación del huevo fecundado en el endometrio del útero.

Anovulación: Ausencia de ovulación.

Antro: Cavidad que se forma en el folículo maduro, donde se acumula el fluido folicular, con hormonas y sustancias necesarias para la ovulación.

Anticuerpo: Los **anticuerpos** (también conocidos como **inmunoglobulinas**, abreviado Ig) son glicoproteínas del tipo gamma globulina. Pueden encontrarse de forma soluble en la sangre u otros fluidos corporales de los vertebrados, disponiendo de una forma idéntica que actúa como receptor de los linfocitos B y son empleados por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar elementos extraños tales como bacterias, virus o parásitos.

Antígeno: cualquier sustancia extraña al organismo que produce una reacción inmune.

ARN (ácido ribonucleico): molécula formada por un ribo nucleótido de longitud variable que contiene uracilo en vez de timina. Hay tres tipos: ARN mensajero (ARNm), ARN ribosoma (ARNr) y ARN de transferencia (ARNt).

Aspiración de ovocitos: recuperación de los ovocitos contenidos en los folículos maduros para la fecundación in vitro mediante técnicas de reproducción asistida. Se realiza por vía vaginal con una guía ecográfica bajo sedación.

Aspiración quirúrgica de espermatozoides del epidídimo: técnica usada para extraer espermatozoides directamente desde el epidídimo para su uso en

técnicas de in vitro o su congelación para el futuro. Se usa en casos de azoospermia (ausencia de espermatozoides en el eyaculado).

Astenozoospermia: condición por la cual los espermatozoides pierden o reducen su movilidad.

Autosoma: cualquier cromosoma que no es un cromosoma sexual. En humanos hay 22 pares de autosomas.

Blastocito: forma embrionaria que evoluciona a partir de la mórula, es la forma que se implanta en el endometrio; aproximadamente al octavo día post ovulación.

Biopsia testicular: Técnica quirúrgica en la que se obtiene tejido testicular del varón con finalidad diagnóstica o bien para obtener espermatozoides que puedan ser utilizados en ciclos de reproducción asistida.

Blastocele: Cavidad del blastocisto.

Blastómeras: Cada una de las células del embrión.

Cariotipo: estudio de los cromosomas de un individuo.

Capacitación espermática: Cambios bioquímicos y fisiológicos que sufren los espermatozoides en su trayecto hasta el óvulo y que les confieren capacidad fecundante. También se denomina de esta manera al proceso que tiene lugar en el laboratorio de reproducción asistida al capacitar las muestras de semen para su posterior utilización en ciclos de reproducción asistida.

Células germinales: Células reproductivas: espermatozoides y óvulos.

Células somáticas: Todas las células del organismo, excepto las células reproductivas (espermatozoides y óvulos).

Criopreservación: Técnica mediante la cual los tejidos o células son congeladas a muy bajas temperaturas (generalmente entre -80 y -196 °C). En reproducción asistida hace referencia a la criopreservación de espermatozoides, ovocitos o embriones.

Criptorquidia: Es un trastorno comúnmente conocido como testículos no descendidos en la bolsa testicular.

Cryo-Top: Método utilizado para la criopreservación y vitrificación de ovocitos.

Centrómero: región del cromosoma que separa los dos brazos y en la que se unen las dos cromátidas. Es la región de unión a las fibras del huso acromático durante la división celular.

Cérvix: el cérvix o cuello uterino es la porción distal del útero contiguo a la vagina que permite la entrada y sirve como reservorio de espermatozoides protegidos por la secreción del moco.

Cigoto: llamado también cigoto o zigote. Se denomina así al ovocito recientemente fecundado durante la primera etapa del desarrollo del embrión.

Citogenética: parte de la genética que estudia la apariencia microscópica de los cromosomas y sus anomalías.

Corpúsculo de Barr: masa de cromatina intensamente teñida que aparece en la periferia de los núcleos de las células somáticas femeninas durante la interfase. Representa el cromosoma X inactivado y condensado.

Cuerpo amarillo: glándula de color amarillo, que se forma en el ovario como producto de la luteinización del folículo inmediatamente después de la ovulación. Si ocurre la fertilización del ovocito, por estimulación de la gonadotropina coriónica secretada por el embrión implantado el cuerpo amarillo se hace más grande y secreta hormonas, fundamentalmente progesterona para sustentar la preñes. En caso de que no se produzca la implantación del cigoto, el cuerpo lúteo desaparece e involuciona hasta formar el cuerpo albicans.

Cuerpo albicans: corpúsculo producto de la transformación del cuerpo amarillo luego de cumplir su función de sintetizar y secretar progesterona después de la ovulación.

Diploide: célula u organismo con dos complementos cromosómicos, que posee un número total de cromosomas que es doble del haploide. El número diploide se representa como $2n$.

Embrión: término usado para describir los estadios iniciales del crecimiento fetal en el humano desde la concepción hasta las ocho semanas de la gestación, cuando se le identifica como feto.

Endodermo: capa celular primera más interna del embrión. A partir de él se origina la cubierta de las cavidades y conductos del organismo y la capa que recubre la mayoría de los órganos internos como el epitelio de la tráquea, los bronquios, los pulmones, el conducto gastrointestinal, el hígado, el páncreas, la vejiga urinaria, la faringe, tiroides, la cavidad timpánica, las amígdalas y las glándulas paratiroides.

Endometrio: membrana mucosa que recubre el interior del útero.

Endotelio: capa de células epiteliales escamosas, derivada del mesodermo, que recubre el corazón, los vasos sanguíneos y linfáticos y las cavidades serosas. Está muy vascularizada y cicatriza rápidamente.

Epidídimo: tubo largo enrollado sobre el polo posterior del testículo, donde maduran los espermatozoides testiculares antes de pasar al vaso deferente.

Espermograma (espermatoograma): consiste en el estudio de las características cualitativas y cuantitativas del semen. Siempre debe ser solicitado entre los primeros estudios de la pareja infértil. Las alteraciones que se pueden ver:

Normospermia: espermograma normal

Oligospermia: concentración espermática disminuída

Astenospermia: movilidad menor a la normal

Teratozoospermia: formas anormales elevadas

Azoospermia: ausencia de espermatozoides en el eyaculado

Aspermia: ausencia de eyaculado

Espermatogénesis: producción y maduración espermática dentro de los testículos. La espermatogénesis en el humano dura aproximadamente 76 días.

Esterilidad: es un trastorno por el cual un individuo o una pareja no pueden concebir bajo ninguna circunstancia.

Estrógenos: nombre genérico dado a los esteroides sintetizados por el ovario, las suprarrenales y la unidad placentaria, responsables de los caracteres

sexuales secundarios femeninos. Su función es preparar al endometrio para la implantación del huevo fecundado, regular la producción de FSH y LH e intensificar el efecto de la progesterona.

Extracción de ovocitos: técnica de reproducción asistida que consiste en la recuperación de los ovocitos contenidos en los folículos ováricos para la fertilización in vitro.

Eyaculación: expulsión súbita del semen a través de la uretra que se produce habitualmente con el orgasmo masculino durante la cópula. La eyaculación es retrógrada cuando se expulsa el semen hacia la vejiga urinaria.

Falla testicular: déficit de la función del testículo como glándula exocrina (espermatogénesis) o endocrina (secreción hormonal).

Fecundación: fusión del óvulo y el espermatozoide. In vivo ocurre en la trompa de Falopio. In vitro ocurre en medios de cultivo de laboratorios.

Fenotipo: conjunto de características observables de un organismo o grupo, fruto de la interacción entre su genotipo y el ambiente en que éste se expresa.

Feto: producto de la concepción posterior al período embrionario cuando ya se ha iniciado el desarrollo de las principales características estructurales, habitualmente desde la octava semana después de la fecundación hasta el momento del parto.

Fibroblasto: célula indiferenciada del tejido conectivo que da lugar a diversos elementos precursores como el condroblasto, el colagenoblasto y el osteoblasto.

Estas células precursoras forman los tejidos fibrosos, de soporte y unión del cuerpo.

FIV (Fertilización In Vitro): técnica de reproducción asistida mediante la estimulación folicular múltiple con gonadotrofinas exógenas, aspiración de los ovocitos, inseminación de los mismos en el laboratorio, cultivados entre 48 y 120 horas y transferencia al útero.

Folículo: sitio donde se encuentra, desarrolla y madura el ovocito rodeado por células de la granulosa y separado del estroma ovárico por una membrana. En su evolución se conoce el folículo primordial, folículo primario, folículos secundarios (aparición de líquido folicular) y folículo de Graff o preovulatorio.

FSH (Hormona Foliculoestimulante): gonadotrofina producida y liberada por la hipófisis que estimula en la mujer la maduración del folículo para la ovulación, mientras que en el varón estimula la producción de espermatozoides en los túbulos seminíferos de los testículos.

Gametos: ovocitos y espermatozoides. Son las células reproductivas de la mujer y del varón respectivamente.

Genes: unidades básicas y funcionales de la herencia, cada una de las cuáles ocupa un lugar específico en los cromosomas.

Genotipo: conjunto de los alelos de un individuo en uno, varios o todos sus loci.

Glándulas endocrinas: órganos que producen hormonas, las cuáles son liberadas para controlar diversos procesos corporales.

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas.

Gónadas: los ovarios y los testículos son las glándulas que producen las células reproductivas (ovocitos y espermatozoides) y las hormonas sexuales (estrógenos y progesterona en el ovario y testosterona en el testículo).

Haploide: célula con un solo complemento cromosómico, como sucede en la gametogénesis tras la meiosis reduccional. En humanos el número haploide es de 22 cromosomas autosómicos y uno sexual (X o Y).

Hidrocele: es un aumento de volumen del testículo debido a la acumulación de líquido en la túnica vaginal que rodea esta glándula y que normalmente deja una cavidad virtual.

Hormona: sustancia producida por una glándula endocrina específica, la cual al ser liberada, ejerce una acción sobre cualquier tejido que tenga receptores específicos.

Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH/LHRH): hormona secretada por el hipotálamo que actúa a nivel hipofisiario para controlar la síntesis y secreción de la hormona estimulante de los folículos (FSH) y de la hormona luteinizante (LH).

hCG (Gonadotrofina Coriónica Humana): gonadotrofina producida por el sincitio-trofoblasto del embrión implantado y luego por la placenta humana.

HMG (Gonadotrofina Menopáusica Humana): mezcla hormonal extraída de la orina de mujeres postmenopáusicas, purificada y preparada para ser usada en tratamientos de infertilidad. Incluye a las hormonas FSH y LH a partes aproximadamente equivalentes.

Hipertestimulación ovárica: síndrome clínico caracterizado por una sobreestimulación anormal del ovario; producido por administración de gonadotrofinas exógenas durante los procesos de inducción de la ovulación.

Hipotálamo: glándula endocrina localizada en la base del cerebro, la cual regula la secreción de hormonas hipofisarias y controla la temperatura corporal y el apetito.

Hipófisis (pituitaria): glándula endocrina localizada en la base del cerebro que produce FSH, LH y otras hormonas relacionadas no solo con la reproducción humana, sino también con el crecimiento, el metabolismo, la pigmentación de la piel, las situaciones de estrés, el desarrollo, etc.

Hormonas esteroideas: grupo de hormonas liposolubles secretadas por los testículos (andrógenos), ovarios (estrógenos y progesterona), corteza adrenal (gluco y mineralocorticoides) y placenta (síntesis parcial de lo anteriormente citado).

ICSI: Inyección intracitoplásmica de espermatozoide en ovocito.

Implantación: proceso en el cual el ovocito fertilizado se anida en el endometrio durante las etapas más tempranas del desarrollo embrionario.

Inducción de la ovulación: tratamiento médico para estimular el crecimiento y desarrollo de los folículos, así como para activar la ovulación.

Infertilidad idiopática: término usado cuando la causa de la infertilidad de una pareja sigue sin explicarse después de una evaluación médica completa.

In vitro: expresión de origen latín que significa “en un vidrio” que quiere decir en un tubo de ensayo en el laboratorio en vez de ser dentro de un ser vivo.

Inseminación artificial o asistida: procedimiento que facilita el encuentro del espermatozoide con el óvulo. El semen se deposita en la entrada del cuello cervical o directamente dentro del útero con la ayuda de una cánula.

LH (hormona luteinizante): hormona sintetizada y secretada por la hipófisis que estimula la liberación del ovocito en el folículo maduro e induce la formación del cuerpo lúteo, el cual produce la progesterona ovárica. En el testículo estimula la producción de testosterona a nivel de las células de Leydig.

Meiosis: división celular que tiene lugar durante la formación de los gametos, mediante la cual una célula germinal diploide (44XX o 44XY) da lugar a gametos haploides (ovocito 22X o espermatozoide 22X o 22Y).

Mellizos dicigóticos: mellizos producidos por la fecundación de dos óvulos con dos espermatozoides.

Mellizos homocigóticos: mellizos producidos por la fecundación de un óvulo con un espermatozoide.

Mesodermo: capa celular intermedia de las tres que forman el embrión en desarrollo. De ella se derivan los huesos, el tejido conectivo, los músculos, la sangre, los tejidos linfático y vascular, la pleura, el pericardio y el peritoneo.

Metabolismo: todos los procesos bioquímicos que ocurren en un organismo vivo, en particular aquellos asociados con el intercambio de materia y energía entre una célula y su entorno.

Metafase: segunda fase de la división celular, en la que los cromosomas aportan un complemento igual a las dos células hijas provenientes de esa división.

Moco cervical: el moco cervical es producido por el cérvix y permite el pasaje de los espermatozoides al útero. El volumen y las características del mismo cambian durante la ovulación para favorecer la llegada de los espermatozoides.

Mosaicismo: coexistencia en un individuo de dos o más líneas celulares con distintas constitución cromosómica pero que proceden del mismo cigoto.

Mutación: cualquier modificación introducida en una secuencia de nucleótido que sea estable.

Neurodermo: implantación del óvulo fertilizado en el endometrio del útero.

Nidación: implantación del óvulo fertilizado en el endometrio del útero.

No-disjunción: error en la separación de cromosomas homólogos (en mitosis o en la primera división meiótica) o de cromátidas hermanas (en la segunda división meiótica) o de cromátidas hermanas (en la segunda división meiótica) hacia polos opuestos, que provoca aneuploidías en las células hijas.

Oligozoospermia: número anormalmente bajo de espermatozoides en el eyaculado.

Orquitis: inflamación aguda de un testículo.

Ovocito: célula reproductora femenina. Al nacimiento un ovario contiene entre 1 y 2 millones de ovocitos, en la pubertad quedan reducidos a unos 300.000 y solamente entre 400 y 500 completan el proceso de ovulación.

Ovarios: dos glándulas, ubicadas a ambos lados del útero, las cuáles producen los óvulos y las hormonas sexuales femeninas.

Ovulación: es la ruptura del folículo maduro con expulsión del óvulo a la cavidad pélvica y el cual es captado por el oviducto, se produce usualmente después del celo en la mayoría de las especies.

PCR (reacción en cadena de polimerasa): técnica de laboratorio para la amplificación enzimática de secuencias específicas de ADN.

PESA: aspiración percutánea de espermatozoides del epidídimo.

PGD: diagnóstico genético preimplantacional.

Placenta: órgano de origen fetal adherido a la pared del útero, el cuál alimenta y oxigena al feto a través del cordón umbilical.

Progestágenos: compuestos sintéticos con actividad progestacional.

Progesterona: hormonal sexual femenina secretada por el cuerpo lúteo del ovario luego de la ovulación para preparar el endometrio para el embarazo. También es producida por la placenta durante el embarazo.

Prolactina: hormona secretada por la hipófisis que estimula en las mamas la secreción láctea. El aumento anormal de esta hormona puede producir infertilidad femenina y masculina.

Quimera: individuo compuesto por líneas celulares genéticamente diferentes y procedentes de distintos cigotos.

Receptores: compuestos de naturaleza proteica situados en sitios estratégicos de la membrana celular o del núcleo de diversos tipos de células.

Semen: secreción expulsada durante el orgasmo masculino, compuesto por la secreción de glándulas anexas y espermatozoides.

Síndrome: conjunto de signos y síntomas resultantes de una causa común o que aparecen en combinación como expresión del cuadro clínico de una enfermedad o una alteración hereditaria.

Testículos: órganos sexuales del varón. Están contenidos en el escroto y son los responsables de la producción de hormonas masculinas y de los espermatozoides.

Testosterona: hormona sexual masculina producida por el testículo y en menor proporción por las otras glándulas esteroideogénicas.

Transferencia de embriones: procedimiento de fertilización asistida que consiste en la colocación del embrión fecundado en día 2, 3 o 5 en el útero directamente.

Triploidía: se refiere a tres números haploides de cromosomas ($3n$).

Trisomía: se refiere a la existencia de un cromosoma supernumerario ($3n+1$).

Utero: órgano que aloja al feto y lo nutre hasta el nacimiento.