

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



“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS FACTORES EMBRIOTRÓFICOS A  
DIFERENTES TENSIONES DE OXÍGENO EN CULTIVO *in vitro* SOBRE LA TASA  
DE DESARROLLO EMBRIONARIO HASTA LA ETAPA DE BLASTOCISTO EN  
ALPACAS”

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. ANGELINA PUMA IQUISE

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2018

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

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE FACTORES EMBRIOTRÓFICOS A DIFERENTES TENSIONES DE OXÍGENO EN CULTIVO *in vitro* SOBRE LA TASA DE DESARROLLO EMBRIONARIO HASTA LA ETAPA DE BLASTOCISTO EN ALPACAS”.

PRESENTADA POR:

Bach. ANGELINA PUMA IQUISE

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

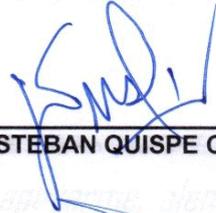


APROBADA POR:

PRESIDENTE:

  
Dr. FELIPE SANTIAGO AMACHI FERNANDEZ

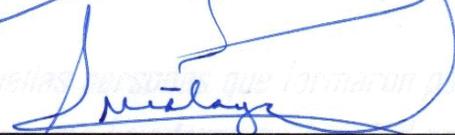
PRIMER MIEMBRO:

  
M.Sc. JESUS ESTEBAN QUISPE COAQUIRA

SEGUNDO MIEMBRO:

  
M.Sc. WILBÚR RUBEN AYMA FLORES

DIRECTOR DE TESIS:

  
Dr. JULIO MALAGA APAZA

ASESOR DE TESIS:

  
Dr. TEODOSIO HUANCA MAMANI

ASESOR DE TESIS:

  
MVZ. JHUNIOR CCOPA CCALLATA

Área : Reproducción Animal  
Tema : Desarrollo embrionario en alpacas  
Fecha de Sustentación: 02/10/2018

## DEDICATORIA

*A Dios quien me dio la sabiduría, fe, la fortaleza, la salud y la esperanza para terminar este trabajo.*

*A mis padres, **Roberta Iquise y Aparicio Puma**, quienes, a lo largo de mi vida, con mucho amor, sacrificio y comprensión me han brindado todo el apoyo, siempre confiaron y me impulsaron para poder lograr mis objetivos y metas, y hoy por hoy todo lo que soy y lo que cumplí los debo a ellos.*

*A mí querido hermano **Leonel Puma Iquise** por su aliento y apoyo en todo momento.*

*A mis tíos **Alfredo Iquise Calla, Adan Iquise Calla y Luz Marina Ramos Apaza** y a todas sus hijas por el apoyo y los consejos que recibí durante toda mi vida profesional.*

*Con eterna gratitud a **Edwin Pari**, quien supo apoyarme, alentarme y sobre todo comprenderme.*

*A mi promoción **2017-I** y a todas aquellas personas que formaron parte de mi vida en algún momento. Que me apoyaron y me brindaron su amistad en el periodo de estudio.*

## AGRADECIMIENTO

*A la Universidad Nacional del Altiplano y a los docentes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por haberme brindado todos sus conocimientos para mi formación profesional.*

*Mi infinita gratitud a mis padres Roberta y Aparicio por acompañarme a lo largo de mi existencia, brindándome cariño y apoyo dándome ánimos así mismo ayudándome en que fuera posible, gracias por los consejos y la orientación.*

*Dr. Julio Málaga Apaza, por el asesoramiento y la exigencia durante la ejecución de la presente investigación.*

*Al Programa Nacional de Investigación en Camélidos del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA), por el apoyo logístico y técnico para la realización del presente proyecto.*

*Dr. Teodosio Huanca Mamani, por su asesoría y todo el apoyo técnico brindado.*

*M.V.Z. Jhuniar CCopa CCallata, M.V.Z. Juan Armando Nina Zuñiga y BLGA Lariza Evelyn Pahuara Farfan, con su consistencia, apoyo y asesoramiento que me brindaron durante la elaboración, ejecución y culminación del presente trabajo de investigación.*

*A los docentes miembros del jurado: Dr. Felipe Santiago Amachi Fernandez, M.Sc. Jesús E. Quispe Coaquira, M.Sc. Wilbur Ruben Ayma Flores, agradecerles por la orientación, sus consejos sabios y apoyo brindado.*

*Mis amistades y compañeros: Violeta, Yuli, Estefany, Jimena, Gloria, Dina, Nora, Lucy, Delia, Luz, Odaliz, Nury, Mariam, Liz, Ely, Max, Sosa, Blas, Luis Miguel, Incahuanaco, Abel, Gustavo, Romel, Roy, por los momentos inolvidables durante mi formación profesional.*

## INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
ÍNDICE DE TABLAS .....	8
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS .....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT .....	11
INTRODUCCIÓN .....	12
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1. Producción <i>in vitro</i> de embriones.....</b>	<b>14</b>
2.1.1. Obtención y transporte de los ovarios. ....	14
2.1.2. Recuperación de ovocitos. ....	14
2.1.3. Selección de los ovocitos.....	15
2.1.4. Maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos (MIV).....	16
2.1.5. Suplementación de los medios de maduración <i>in vitro</i> (MIV).....	18
2.1.6. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV).....	18
2.1.7. Cultivo <i>in vitro</i> embrionario.....	19
<b>2.2. Generalidades de los factores embriotróficos o de crecimiento en el cultivo <i>in vitro</i> de embriones.....</b>	<b>22</b>
2.2.1. Familia del factor embriotrófico o de crecimiento epidérmico (EGF).....	25
2.2.2. Familia del factor embriotrófico o de crecimiento insulínico (IGF).....	26
<b>2.3. Influencia de la tensión de oxígeno sobre el desarrollo embrionario. ....</b>	<b>29</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1. Lugar de estudio .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2. Material de estudio .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3 Materiales.....</b>	<b>35</b>
3.3.1. Equipos.....	35
3.3.2. Reactivos. ....	36
<b>3.4. METODOLOGÍA.....</b>	<b>37</b>
3.4.1. Obtención y transporte de los ovarios. ....	37
3.4.2. Maduración <i>in vitro</i> .....	38
3.4.3. Fertilización <i>in vitro</i> con semen fresco .....	39
3.4.4. Cultivo <i>in vitro</i> . ....	41
3.4.5. Prueba estadística. ....	43

<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	45
<b>4.1. Tasa de clivaje post primer cultivo embrionario en KSOMaa con factores embriotróficos a diferentes tensiones de oxígeno por 48 horas.</b> .....	<b>45</b>
4.1.1. Tasa de clivaje por efecto del factor embriotrófico EGF a diferentes tensiones de oxígeno.....	45
4.1.2. Tasa de clivaje por efecto del factor embriotrófico IGF-I a diferentes tensiones de oxígeno.....	47
4.1.3. Tasa de clivaje por efecto de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) bajo una tensión de oxígeno 6%. .....	48
4.1.4. Tasa de clivaje por efecto de los factores embriotróficos (EGF e IGF- I) alta tensión de oxígeno 20%. .....	49
<b>4.2. Tasa de blastocistos post 7 días del segundo cultivo embrionario en medio SOFaa con factores embriotróficos a diferentes tensiones de oxígeno.</b> .....	<b>51</b>
4.2.1. Tasa de blastocistos por efecto del factor embriotrófico EGF a diferentes tensiones de oxígeno.....	51
4.2.2. Tasa de blastocistos por efecto del factor embriotrófico IGF-I a diferentes tensiones de oxígeno.....	53
4.2.3. Tasa de blastocistos por efecto de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) bajo una tensión de oxígeno 6%. .....	55
4.2.4. Tasa de blastocistos por efecto de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) alta tensión de oxígeno 20%. .....	56
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	58
<b>VI. RECOMENDACIONES</b> .....	59
<b>VII. REFERENCIAS</b> .....	60
<b>ANEXOS</b> .....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Incubadora con cámara de CO <sub>2</sub> para cultivo embrionarios .....	80
<b>FIGURA 2:</b> Placa multipocillos con medio de maduración cubiertas con aceite mineral. .....	80
<b>FIGURA 3:</b> Pipeta Pasteur, mango de bisturí número 3, hoja de bisturí número 12, placa Petri cuadrículado. ....	81
<b>FIGURA 4:</b> Ovario con folículos de 2 a 7 mm para ser colectados los ovocitos mediante la técnica slicing. ....	81
<b>FIGURA 5:</b> Recuperación de los ovocitos por el método slicing .....	83
<b>FIGURA 6:</b> Ovocitos de categoría I, II y III .....	83
<b>FIGURA 7:</b> Colección de semen con maniquí. ....	84
<b>FIGURA 8:</b> Separación de espermatozoides con el método Percoll 45% y 22.5% y la capacitación espermática.....	84
<b>FIGURA 9:</b> Fertilización por inseminación con espermatozoides capacitados. ....	85
<b>FIGURA 10:</b> Ovocito madurado por 32 horas, en la imagen se observa con el primer corpúsculo polar y con presencia del espacio peri vitelino.....	87
<b>FIGURA 11:</b> Aparición del segundo corpúsculo polar en ovocitos evaluados 10 horas post fertilización.....	87
<b>FIGURA 12:</b> Cigotos en división celular. ....	87
<b>FIGURA 13:</b> Blastocistos expandidos con adición del factor embriotrófico EGF cultivados a una tensión de oxígeno de 6% .....	88
<b>FIGURA 14:</b> Blastocistos eclosionados con adición del factor embriotrófico IGF cultivados a una tensión de oxígeno. ....	88

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> distribución de ovocitos de alpacas.....	34
<b>Tabla 2:</b> Efecto del factor embriotrófico (EGF) a diferentes tensiones de oxígeno.....	45
<b>Tabla 3:</b> Efecto del factor embriotrófico (IGF-I) a diferentes tensiones de oxígeno.....	47
<b>Tabla 4:</b> Efecto de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) con 6% de oxígeno. ....	48
<b>Tabla 5:</b> Efecto de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) con 20% de oxígeno. ...	49
<b>Tabla 6:</b> Efecto del factor embriotrófico (EGF) a diferentes tensiones de oxígeno.....	52
<b>Tabla 7:</b> Efecto del factor embriotrófico (IGF-I) a diferentes tensiones de oxígeno.....	53
<b>Tabla 8:</b> Efecto de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) con 6% de oxígeno. ....	55
<b>Tabla 9:</b> Efecto de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) con 20% de oxígeno.....	56
<b>Tabla 10:</b> (PBS) Solución buffer fosfato (stock) .....	77
<b>Tabla 11:</b> Medio de maduración TCM-199.....	77
<b>Tabla 12:</b> Medio de FERT-TALP de trabajo.....	77
<b>Tabla 13:</b> Medio de TALP-SPERM solución de trabajo .....	78
<b>Tabla 14:</b> Medio de cultivo para primer cultivo embrionario KSOM.....	78
<b>Tabla 15:</b> Medio de cultivo para el segundo cultivo embrionario SOF. ....	79

## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

<b>aa:</b>	Aminoácidos.
<b>ATB:</b>	Antibiótico
<b>BSA:</b>	Albúmina sérica bovina.
<b>°C:</b>	Grados centígrados
<b>CCO:</b>	Complejo cúmulos ovocito.
<b>CO<sub>2</sub>:</b>	Dióxido de carbono.
<b>FIV:</b>	Fecundación in vitro.
<b>FSH:</b>	Hormona folículo estimulante.
<b>LH:</b>	Hormona luteinizante.
<b>MIV:</b>	Maduración in vitro.
<b>N<sub>2</sub>:</b>	Nitrógeno.
<b>O<sub>2</sub>:</b>	Oxígeno.
<b>PBS:</b>	Solución buffer fosfato
<b>PHE:</b>	Penicilamina, Hipotaurina, Epinefrina
<b>ROS:</b>	Especies reactivas de oxígeno.
<b>SOF:</b>	Fluido oviductual sintético.
<b>TCM:</b>	Medio de cultivo tisular
<b>UI:</b>	Micro litro
<b>mL:</b>	Mililitro
<b>EGF:</b>	Insulin growth factor
<b>IGF:</b>	Epidermal growth factor
<b>SFB:</b>	Suero fetal bovino
<b>KSOM:</b>	Potassium Simplex Optimized Medium with aminoacids.

## RESUMEN

El estudio se realizó en el Centro de Innovación y Producción Quimsachata – Lampa – Puno; con el objetivo de evaluar el efecto de factores embriotróficos (EGF e IGF-I) y diferentes tensiones de oxígeno (6% y 20%) en cultivo *in vitro* sobre la tasa de desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto en alpacas; para lo cual se recolectaron 215 ovarios procedentes de alpacas beneficiadas en el Camal Municipal de Nuñoa, los mismos fueron trasladados en solución salina+ATB a una temperatura de 37°C en termos de boca ancha. De los ovarios se colectaron 1156 ovocitos, de los cuales se seleccionaron 1051. Los ovocitos selectos fueron divididos en cinco grupos: 205 para el grupo 1 EGF 6% de oxígeno, 219 para el grupo 2 EGF 20% de oxígeno, 206 para el grupo 3 IGF-I 6% de oxígeno, 210 para el grupo 4 IGF-I 20% de oxígeno y para el grupo control 211 ovocitos. Todos los grupos fueron madurados con medio TCM-199 suplementados con piruvato de sodio, glutamina, gentamicina, suero fetal bovino, estradiol, hormona luteinizante, folículo estimulante y sometidos a la incubadora a una temperatura de 38.5°C, 5% de CO<sub>2</sub>, mayor humedad relativa por 32 horas. Por otra parte, en la fertilización *in vitro* se trabajó con espermatozoides colectados por maniquí y diluidos con dilutor y capacitados con heparina, penicilamina, hipotaurina y epinefrina. Los ovocitos maduros fueron desnudados parcialmente por pipeteo suave y colocados en 80 uL de medio de fecundación y luego se procedió con inseminación de espermatozoides capacitados bajo incubación por 10 horas. Pasadas las 10 horas los presuntos cigotos fueron colocados en medio KSOM suplementados con los factores embriotróficos a diferente tensión de oxígeno por 48 horas. Los resultados que se obtuvieron fue una tasa de clivaje para el primer grupo de 24.9%, segundo grupo 5.9%, tercer grupo 20.4 %, cuarto grupo 11.4% y para el grupo control 15.6%. Pasadas las 48 horas post primera evaluación se cambió al segundo cultivo embrionario SOF suplementado con los factores embriotróficos a diferente tensión de oxígeno hasta el día 7; del cual se logró una tasa de blastocisto para el primer grupo de 14.15%, segundo grupo 5.48%, tercer grupo 18.45%, cuarto grupo 6.67% y para el grupo control 2.84%. En conclusión, los resultados sugieren la adición de los factores embriotróficos a los medios de cultivo embrionario *in vitro* y una baja tensión de oxígeno al 6% son favorables para el desarrollo embrionario en alpacas.

**Palabra Clave:** Blastocisto, clivaje, medio, cultivo.

## ABSTRACT

The study was carried out at the Quimsachata - Lampa - Puno Innovation and Production Center; with the aim of evaluating the effect of embryotonic factors (EGF and IGF-I) and different oxygen tensions (6% and 20%) in in vitro culture on the rate of embryonic development up to the blastocyst stage in alpacas; for which 215 ovaries were collected from alpacas benefited in the Municipal Camal of Nuñoa, they were transferred in saline solution + ATB at a temperature of 37 ° C in wide mouth thermos. From the ovaries, 1156 oocytes were collected, of which 1051 were selected. The selected oocytes were divided into five groups: 205 for group 1, EGF 6% oxygen, 219 for group 2, EGF 20% oxygen, 206 for group 3 IGF-I 6% oxygen, 210 for group 4 IGF-I 20% oxygen and for control group 211 oocytes. All groups were matured with TCM-199 medium supplemented with sodium pyruvate, glutamine, gentamicin, fetal bovine serum, estradiol, luteinizing hormone, follicle stimulating and submitted to the incubator at a temperature of 38.5 ° C, 5% CO<sub>2</sub>, higher Relative humidity for 32 hours. On the other hand, in in vitro fertilization we worked with sperm collected by mannequin and diluted with dilutor and trained with heparin, penicillamine, hypotaurine and epinephrine. The mature oocytes were partially stripped by gentle pipetting and placed in 80 uL of fertilization medium and then sperm inseminated under incubation for 10 hours. After 10 o'clock the presumed zygotes were placed in KSOM medium supplemented with embryotic factors at different oxygen tension for 48 hours. The results obtained were a rate of cleavage for the first group of 24.9%, second group 5.9%, third group 20.4%, fourth group 11.4% and for the control group 15.6%. After 48 hours after the first evaluation, the second SOF embryo culture supplemented with embryotomatic factors at different oxygen tension was changed until day 7; of which a blastocyst rate was achieved for the first group of 14.15%, second group 5.48%, third group 18.45%, fourth group 6.67% and for the control group 2.84%. In conclusion, the results suggest the addition of embriotrophic factors to embryonic culture media in vitro and a low oxygen tension of 6% are favorable for embryonic development in alpacas.

**Key Words:** Blastocyst, cleavage, culture medium.

## INTRODUCCIÓN

En América latina la mayor población de alpacas se encuentra en el Perú con 3'685,516 seguida de Bolivia (456,794) alpacas y poblaciones más pequeñas se encuentran en: Chile (45,224), Ecuador (200) y Argentina con menos de 1,000 alpacas. Dentro del país, el departamento de Puno posee 1'459,903 de alpacas, que representan el 39.61%, seguido del departamento Cusco con 545,454 (14.80%), Arequipa con 468,392 (12.71%). Estas cifras demuestran que la mayor concentración de la población de alpacas se encuentra en la macrorregión sur del Perú (CENAGRO, 2013).

La posibilidad de mejora genética de los rebaños de alpacas mediante la prueba de progenie, con la formación de núcleos de reproductores, requiere años de trabajo y está limitada, entre otros factores, por el largo intervalo generacional y la capacidad fisiológica de una hembra que solo puede tener solo una cría al año, esto por presentar un periodo de gestación prolongado de 11.5 meses (Novoa C.1999).

En la producción animal, el desarrollo de tecnologías reproductivas como la Inseminación Artificial, Transferencia de embriones y Fecundación *in vitro*, se presentan como importantes alternativas para contribuir a mejorar la calidad genética de los rebaños de alpacas y en un menor tiempo. La técnica de fertilización *in vitro* (FIV) es una de las tecnologías de mayor desarrollo en los últimos años (Huanca, 2012) e involucra el control de los mecanismos de maduración e interacción de los gametos femenino y masculino en un ambiente artificial (Filipiak y Larocca, 2010).

Existen reportes que afirman que es posible producir embriones *in vitro* en camélidos sudamericanos: (Del campo et al., 1994, Ratto *et al.*, 2005, Giuliano

et al. 2010.), pero es necesario desarrollar un medio adecuado de cultivo (co-cultivo, factores embriotróficos) además existe evidencia que señala que la concentración de oxígeno influye en el desarrollo embrionario (Leese, et al., 1998).

La producción de embriones *in vitro* en bovinos es a nivel comercial, en forma de embriones frescos o congelados, oscilando las tasas de preñez entre 40% y 50% respectivamente, favoreciendo una mayor eficiencia y el avance genético en esta especie (Sánchez et al., 2016), de allí que su adaptación en alpacas tendría similares beneficios (Adams y Ratto, 2001); sin embargo, estudios realizados en producción de embriones *in vitro* con el objetivo de desarrollar protocolos en camélidos sudamericanos son insuficientes.

Por lo mencionado anteriormente, el trabajo de investigación tuvo por objetivo:

- Evaluar la tasa de clivaje post primer cultivo embrionario (48h) en medio KSOMaa con adición de factores embriotróficos (EGF y IGF-I) a diferentes tensiones de oxígeno.
- Evaluar la tasa blastocistos post 7 días de segundo cultivo embrionario en SOFaa con factores embriotróficos (EFF e IGF-I) a diferentes tensiones de oxígeno.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Producción *in vitro* de embriones.

La producción *in vitro* de embriones, incluye varios procedimientos, como la recolección de ovocitos, la maduración de los ovocitos, la fecundación *in vitro*, y la puesta en cultivo de los embriones obtenidos.

#### 2.1.1. Obtención y transporte de los ovarios.

Los ovarios que son colectados para este tipo de procedimientos provienen de animales que han sido beneficiados para abasto público (Herrera y Jara, 2009); los ovarios son colectados directamente del tracto reproductor de los animales luego del sacrificio. Se colocan en un termo que contiene solución salina a 0.9% (NaCl) + antibiótico con una temperatura inicial de 35°C (Huanca et al., 2014).

#### 2.1.2. Recuperación de ovocitos.

La técnica utilizada para recuperar los ovocitos a partir de los ovarios obtenidos en el matadero debe cumplir dos requisitos: Obtener la mayor cantidad de complejos cúmulo-ovocito (CCO) posible de cada uno de los ovarios utilizados y garantizar que los mismos conserven su calidad (citoplasma homogéneo y varias capas compactas de células del cúmulo), para que puedan ser utilizados en la maduración, fecundación y cultivo *in vitro* (Katska, 1989; González et al., 1992).

Para la obtención de los ovocitos, se han descrito dos métodos: el método de aspiración y el método de corte (Gardon, 1999). El método de aspiración, consiste en la succión de los folículos situados en la superficie del ovario

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

### 2.1.3. Selección de los ovocitos.

La selección de los ovocitos se realiza generalmente en base a tres criterios: el diámetro de ovocitos, el aspecto de su citoplasma y las características del cúmulo que los rodea. El diámetro de los ovocitos condiciona su capacidad para madurar (Sato y Montoya, 1990). Estudios han demostrado que la calidad del complejo cúmulo ovocito (CCO) tiene una implicancia directa sobre el potencial de maduración de los ovocitos; además la calidad de los ovocitos se estima al evaluar el número de capas de células que lo rodean y la morfología del citoplasma (Seneda *et al.*, 2001). La calidad de los ovocitos se estima regularmente luego de evaluar el número de capas de células que lo rodean y la morfología del citoplasma

(Seneda *et al.*, 2001); además, los ovocitos pueden ser categorizados de acuerdo al número de capas de células de los cúmulos y la apariencia del citoplasma. De estas categorías en general se considera que solamente los ovocitos de categorías I y II poseen un elevado potencial para desarrollarse a embriones por fertilización *in vitro* en comparación a las categorías III (Lonergan *et al.*, 1991). En un estudio realizado por Huanca *et al.*, (2007) empleo la siguiente clasificación:

- Ovocitos categoría I (excelentes) presentan citoplasma oscuro uniforme combinado con 3 o más capas compactas de los cúmulos.
- Ovocitos categoría II (buenos) presentan citoplasma oscuro uniforme conjuntamente con una corona radiada completa pero menos de 3 capas del cúmulo.
- Ovocitos categoría III (regulares) presentan una pérdida de la uniformidad del citoplasma, la corona radiada se presenta incompleta y las capas de los cúmulos presentes son menos compactas.

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

#### **2.1.4. Maduración *in vitro* de los ovocitos (MIV).**

Tan pronto como se ha separado el ovocito de su ambiente folicular, los ovocitos espontáneamente, reinician la meiosis en cultivo, pero esta

maduración es incompleta, debido a que no están capacitados para inducir una des condensación completa de la cabeza espermática después de su fecundación (Sirard *et al.*, 2003). Por lo tanto, la maduración debe realizarse tanto nuclear como citoplasmáticamente; nuclearmente debe observar la expulsión del primer corpúsculo polar lo que indica que el ovocito se encuentra en metafase II (MII). Sin embargo, la evaluación de la maduración citoplasmática es más compleja.

Para la maduración *in vitro* de los ovocitos se utilizan diferentes medios de cultivo (Ham's F-10 y Ham's F-12, Krebs Ringer Bicarbonato modificado, TCM-199 y MEM); todos ellos, presentan en su composición una mezcla de sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, glucosa, piruvato de sodio, hipoxantina, timidina y rojo fenol como indicador, en dichos medios, los componentes varían en diferentes proporciones de sus componentes; a pesar de la amplia variedad de ellos descrita, el más utilizado es el TCM-199 (Gliedt *et al.*, 1996).

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

### 2.1.5. Suplementación de los medios de maduración *in vitro* (MIV).

El suero fetal bovino (SFB) junto con la albúmina sérica bovina (BSA) es el complemento orgánico de los medios. Aunque aún ciertos cultivos celulares requieren de suero como complemento, existe la evidencia suficiente que los ovocitos pueden ser madurados con éxito sin la presencia de suero en el medio (Bever y cols, 1997; Alberio y Palma, 1997 citado por Palma, 2001). Recientemente, se ha estudiado un sustituto de suero sintético suplementado con factor de crecimiento epidérmico (EGF) para reemplazar el suero fetal bovino en el medio de maduración, demostrando resultados similares a los grupos control con suero (Sagirkaya *et al.*, 2007).

La adición de sustancias promotoras del crecimiento al medio de cultivo (Gonadotropinas, esteroides, factores de crecimiento), ha sido tomada en cuenta para mejorar el desarrollo ovocitario después de la recuperación (Lonergan *et al.*, 2008). La suplementación hormonal incluye el uso de las hormonas gonadotropinas LH y FSH que se hace con una de las gonadotropinas o la combinación de ambas (Palma *et al.*, 2001).

### 2.1.6. Fecundación *in vitro* (FIV).

La fecundación es un proceso complejo que resulta de la unión del espermatozoide y el ovocito. Esto señala el comienzo de la transición de ovocito a embrión. Para la correcta fecundación *in vitro* se requiere una apropiada preparación de ambos gametos, y también de unas condiciones de cultivo favorables (Gordon, 2003).

Entre los procedimientos de separación y selección de los espermatozoides para el proceso *in vitro*, generalmente se realizan las técnicas de selección

por gradientes y el “swim-up”. Estas técnicas tienen como objeto separar los espermatozoides del plasma o diluyente seminal, para obtener una muestra con mayor porcentaje de espermatozoides motiles. Las técnicas de selección en gradientes se utilizan para separar diferentes tipos de células. Esta técnica depende del principio de la centrifugación sobre un gradiente de densidad coloidal, en donde las células se moverán hasta un punto en el gradiente correspondiente a su densidad. El plasma seminal permanece en la parte alta del gradiente y los espermatozoides se dirigen en dirección a la fuerza centrífuga y se precipitan más rápido que los inmóviles. La otra técnica llamada “swim-up” fue desarrollada por Parrish *et al.*, (1984) y se fundamenta en la motilidad que poseen los espermatozoides en mejores condiciones, dándole una capacidad migratoria ascendente durante un periodo determinado en un medio definido. El TALP (Tyrodes modified medium) o el BO (Brackett and oliphant medium) son los medios de fecundación comúnmente utilizados.

#### **2.1.7. Cultivo *in vitro* embrionario.**

El cultivo *in vitro* embrionario trata de simular las condiciones en las que se desarrolla un embrión preimplantacional desde el estadio de cigoto hasta el estadio de blastocisto. La composición de diferentes formulaciones empleadas en el cultivo embrionario, básicamente se trata de una solución salina suplementada con una fuente de energía (piruvato, glucosa o lactosa) y una fuente proteica (suero o albúmina sérica bovina). Existen algunos medios complejos como el TCM-199, Ham’s F10 o Menezo B2 que contienen vitaminas o aminoácidos en número y concentraciones variables y otros más simples que son empleados con éxito en la actualidad y que

también son suplementados con aminoácidos: como es el SOFaa (Syntetic Oviductal Fluid) (Holm *et al.*,1999).

Los requerimientos de aminoácidos cambian a medida que el embrión se va desarrollando desde la etapa de división hasta el estadio de blastocisto, esto fue demostrado por Steeves y Gardner, (1999) en un estudio donde se utilizó como medio base el SOFaa modificado, el cual contenía sales, glucosa, lactato de sodio, glutamina, piruvato, betaína y antibióticos. Este estudio reveló que no solamente el vacuno tiene requerimientos de aminoácidos, si no que los aminoácidos tienen un efecto tanto diferencial como temporal durante el desarrollo de cigoto a blastocisto. El desarrollo de las etapas tempranas de división es estimulado por los aminoácidos no esenciales y la glutamina. Mientras que el desarrollo después del día 4 es estimulado por la combinación de los aminoácidos no esenciales y aminoácidos esenciales y la glutamina.

La glucosa es incluida en la mayoría de medios como una fuente de energía. Es metabolizada principalmente por medio del glicólisis a una forma de piruvato, el cual se puede convertir a lactato o acetoacetato, puede entrar el ciclo de ácido cítrico y es oxidada en forma de CO<sub>2</sub> y agua. La acumulación de ácido láctico en el medio particularmente evidente en células embrionarias, implica que el ciclo de ácido cítrico no funciona totalmente de la forma que lo hace *in vivo*, y los datos recientes muestran que la cantidad del carbono presente se deriva de la glutamina más que la glucosa. Este descubrimiento puede explicar los altos requerimientos excepcionales de algunos tipos celulares de glutamina o glutamato (Freshney, 2005). Otros componentes pueden ser adicionados al medio

como iones, factores de crecimiento, citoquinas y hormonas importantes en el desarrollo de los embriones formando parte de formulación de algunos medios si la relación coste/beneficio lo justifica (Palma *et al.*, 2001).

Usualmente, es utilizado un medio diferente para cada fase de la producción de embriones *in vitro*; maduración, fecundación y cultivo. El periodo de cultivo puede ser dividido en dos fases requiriendo cada una diferentes medios, permitiéndonos evaluar el desarrollo del blastocisto en las dos diferentes etapas de división embrionaria y estos tiempos pueden dar información adicional para la selección de los diferentes sustratos para el desarrollo embrionario temprano (Pinyopummintr *et al.*, 1996).

Un estudio realizado por Gandhi *et al.*, (2000) demostró que para tener unas condiciones ideales y evitar el estrés causado por la manipulación en cada una de las fases de la producción de embriones, lo ideal sería tener un solo medio de cultivo definido para ser utilizado desde la maduración ovocitaria, hasta la obtención del blastocisto, evitando así los cambios de pH, de os molaridad, los niveles de iones, los sustratos energéticos y otros factores.

La producción *in vitro* de embriones con fines reproductivos requiere que el sistema de cultivo y sus componentes estén libres de enfermedades específicas y presenten un alto desarrollo embrionario con resultados repetibles. Con la suplementación de cultivos definidos se busca obtener altos desarrollos embrionarios sin la inclusión de sustancias como el suero y la BSA (Lim *et al.*, 2007). La BSA y el suero que son los componentes de la mayoría de los medios de cultivo de embriones, son mezclas indefinidas

y complejas de proteínas, factores de crecimiento y péptidos (Holm *et al.*, 1999). Se han empleado sistemas de cultivo semidefinidos con BSA durante la maduración, fecundación y cultivo que resulta en el desarrollo de porcentajes de eclosión iguales a los sistemas con presencia de suero durante la maduración y partes del periodo de cultivo. Para poder realizar el estudio de otro tipo de sustancias como componentes del medio de cultivo, es necesario un medio definido o lo más definido posible, para evitar los efectos que puedan ser causados por parte del suero.

Se han diseñado multitud de medios simples para mejorar el cultivo de embriones y controlar mejor las condiciones de cultivo: SOF, KSOM y BECM este medio han sido suplementados con diversos componentes al objeto de satisfacer las necesidades de los embriones aminoácidos, debido a su efecto beneficioso durante el desarrollo embrionario temprano, factores de crecimiento para mejorar el porcentaje de blastocisto y la tasa de implantación (Harvey *et al.*, 2007)

## **2.2. Generalidades de los factores embriotróficos o de crecimiento en el cultivo *in vitro* de embriones.**

El uso de la producción de embriones *in vitro* a nivel comercial es limitada, entre otros motivos debido a las alteraciones en la función embrionaria que resultan en una reducida supervivencia embrionaria y fetal, y aumenta las anormalidades fetal, placentaria y neonatal. Una estrategia potencial para mejorar la eficiencia de los sistemas de producción *in vitro* es modificar las condiciones de cultivo de embriones tratando de mimetizar el ambiente del proceso *in vivo*. El ambiente del tracto reproductivo de la hembra contiene

diversos factores de crecimiento y moléculas reguladoras, las cuales controlan el desarrollo embrionario (Block *et al.*, 2007). Algunos estudios en ratones y otras especies muestran que un rango de ligando de factores de crecimiento poli peptídico son producidos a lo largo del tracto reproductivo y también por el embrión preimplantacional, los receptores de estos factores de crecimiento pueden detectarse sobre la superficie embrionaria. Los factores de crecimiento juegan un papel esencial debido a que pueden regular los procesos de mito génesis, diferenciación, metabolismo y apoptosis (Kane *et al.*, 1997).

Los factores de crecimiento como tal son proteínas con un peso molecular inferior a los 30.000 daltons, que al contrario que las hormonas reproductivas conocidas, son sintetizados por varios órganos y tejidos, particularmente cumplen funciones endocrinas y autocrinas, y se liberan inmediatamente después de su síntesis. Tienen una función mitogénica y estimuladora del desarrollo, del crecimiento celular y de tejidos. Los factores embriotróficos o factores de crecimiento se dividen en 5 familias, siendo las más conocidas y estudiadas en los programas experimentales de producción *in vitro* de embriones son las siguientes: el factor de crecimiento insulínico (Insulin growth factor, IGF), el factor de desarrollo epidérmico (Epidermal growth factor, EGF), el factor de crecimiento transformador (Transforming growth factor, TGF) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (Platelet-derived growth factor, PDGF). Han sido estudiados, con el objeto de emplearlos para mejorar los medios empleados en el cultivo *in vitro* de embriones y también para aumentar la eficacia de la maduración de los ovocitos. A pesar de sus acciones sobre

el desarrollo embrionario temprano, los factores de crecimiento no son incluidos rutinariamente en los medios de cultivo de embriones (Block *et al.*, 2007).

Existe gran evidencia en una amplia variedad de especies de mamíferos de que los factores de crecimiento juegan un papel muy importante en el desarrollo del blastocisto. Varios estudios realizados en la especie humana han demostrado que un amplio rango de ligando de factores de crecimiento y sus receptores se expresan durante el desarrollo preimplantacional, y que los factores de crecimiento exógeno parecen afectar principalmente a la formación del blastocisto y que pueden actuar en varias vías de comunicación (Hardy y Spanos, 2002).

Cuando intervienen mediadores locales afectando únicamente a las células del ambiente inmediato a la célula que emite una señal se denomina señalización paracrina. En la comunicación endocrina, las células secretan sus moléculas señal al torrente sanguíneo, transportando la señal a las células diana distribuidas por todo el organismo. En la señalización autocrina, las células envían señales a células del mismo tipo y así mismas, uniéndose a los receptores de la misma célula, siendo más efectiva cuando se lleva a cabo simultáneamente por varias células vecinas del mismo tipo, por lo tanto, puede utilizarse para estimular a grupos de células idénticas, este tipo de comunicación es observado comúnmente en las primeras etapas del desarrollo (Alberts *et al.*, 2004). Durante el desarrollo preimplantacional del embrión humano, la expresión simultánea del ligando y el receptor por parte del embrión sugiere la presencia de una vía de señales autocrinas. La producción de factores de crecimiento por parte del

embrión, en combinación con la expresión del receptor sobre el oviducto y el útero, da evidencia de la señal paracrina desde el embrión hasta el trato reproductivo materno, estando posiblemente, estos factores de crecimiento involucrados con la preparación para la implantación (Hardy y Spanos, 2002).

### **2.2.1. Familia del factor embriotrófico o de crecimiento epidérmico (EGF).**

El EGF en sí mismo es uno de los factores de crecimiento más potentes biológicamente y el mejor caracterizado de la familia. Tiene una amplia gama de acciones en muchos tejidos, estimulando tanto la diferenciación y la proliferación celular (Adams, 1999). Los receptores para el EGF han sido encontrados en las células de la granulosa de ratas e igualmente se han observado ligandos específicos del EGF en las células del cúmulo de vacuno y en células antrales pequeñas de la granulosa. El número de lugares donde se liga el EGF han demostrado estar influenciados tanto por la hormona gonadotropina como por las hormonas esteroideas (Feng *et al.*, 1987). La interacción entre el EGF y las gonadotropinas, juega un papel importante en la acción propuesta del EGF durante la maduración ovocitaria (Harper y Brakett, 1993).

Respecto a la maduración ovocitaria, se ha demostrado que la suplementación del medio TCM-199 con sólo el EGF durante la maduración *in vitro*, en concentraciones fisiológicas, estimula la expansión de las células del cúmulo e incrementa el porcentaje de ovocito que presentan maduración nuclear al igual que la proporción de embriones que llegaban al estadio de blastocisto, pero sin afectar el número de células por blastocisto (Harper y Brackett, 1993). El EGF también altera el modelo de

proteínas neosintetizadas durante la maduración *in vitro* y ha demostrado inducir la expansión del cúmulo independiente de su efecto sobre la meiosis del ovocito (Lonergan *et al.*, 1996).

En vacuno, se han utilizado diferentes concentraciones del EGF, y en general se han obtenido los mejores resultados al utilizar una concentración de 10 ng/ml (Paria y Dey, 1990).

En 2003, Sirisathien y colaboradores realizaron un experimento donde la suplementación de 5 ng/ml a un medio químicamente definido fue beneficioso para el desarrollo de blastocistos de vacuno desde el estadio de 4 células cultivando 20 embriones en 50  $\mu$ L de medio. Sin embargo, ni las concentraciones de 1 y 25 ng/mL mostraron mejores resultados que el grupo control en el desarrollo embrionario. (Poole *et al.*, 2004) realizaron un estudio de cultivo embrionario individualizado suplementando el medio TCM-199 sin suero con 10 ng/ $\mu$ L del EGF en el que supuso una mejoría en el desarrollo *in vitro* hasta blastocisto, respecto al mismo medio no suplementado con el EGF.

### **2.2.2. Familia del factor embriotrófico o de crecimiento insulínico (IGF).**

La familia de los factores de crecimiento insulínico, se compone del factor de crecimiento insulínico de tipo I y de tipo II (IGF-I e IGF-II respectivamente). Los miembros de la familia se relacionan por la secuencia y tiene efectos metabólicos similares a los que presenta la insulina. Estos dos factores de crecimiento tienen una estructura homóloga con la pre insulina (Nissley *et al.*, 1993). Cada uno de los miembros de la familia se liga a su receptor específico en la superficie

celular y también con una reducida afinidad a los receptores heterólogos (Kane *et al.*, 1997). Entre los efectos similares a la insulina encontramos que estimula la toma de la glucosa por las células y que también es mitogénica (Lowe, 1991). La IGF-I actúa como un factor de progresión en el ciclo celular; en su ausencia el ciclo celular puede ser prolongado. Una de las funciones principales del IGF-II puede ser la del control de la tasa de crecimiento durante el desarrollo fetal (Gluckman, 1994).

El factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) es un poli péptido sintetizado en órganos de importancia reproductiva como el hipotálamo, ovario, oviducto y el útero, además de la placenta, el corazón, el pulmón, el riñón, el hígado, el páncreas, el bazo, el intestino delgado, el intestino grueso, el cerebro, la médula ósea y la hipófisis. Los principales tejidos diana afectados en combinación con la hormona del crecimiento son los músculos, cartílagos, huesos, hígado, riñones, nervios, piel, ovarios y pulmones (Daftary y Gore, 2005).

El IGF-I es de naturaleza peptídica y se origina en las células de la teca del ovario. Además, participa en el crecimiento, desarrollo y maduración folicular, juega un papel importante en la foliculogénesis inducida por las gonadotropinas, en la esteroidogénesis ovárica y en la función del cuerpo lúteo (CL) así como la actividad de la pituitaria y del hipotálamo. La elevación plasmática del IGF-I está ampliamente asociada con el estradiol y se torna importante no solamente para el desarrollo folicular, sino también para promover de forma directa la supervivencia del espermatozoide o del embrión precoz (Lenz *et al.*, 2007).

En embriones se ha demostrado claramente que el IGF-I puede ejercer un efecto positivo en la pre implantación de la especie bovina y el desarrollo del embrión (Lima et al., 2006; Stefanello *et al.*, 2006).

En embriones tratados con IGF-I, se logró una tasa de preñez más alta después de la transferencia a las receptoras (Block y Hansen, 2007). Los efectos sobre el embrión son mediados por la acción directa de IGF-I, lo cual es apoyado por la presencia de receptores de IGF-I sobre el embrión durante el desarrollo preimplantacional, pero sigue siendo incierto si el IGF-I circulante en realidad llega al embrión, ya que no hay ninguna correlación entre las concentraciones de IGF-I en plasma y el líquido luminal uterino (Bilby *et al.*, 2006).

Respecto a la suplementación en el medio de MIV, (Palma *et al.*, 1997) realizaron un estudio donde la adición de 10 ng/ml de IGF-I al TCM-199 como medio de maduración que contenía 10% de suero de vaca en estro, tuvo un efecto positivo sobre la tasa de división. Sin embargo, la tasa de división solo fue un efecto temporal, y no presentó un efecto significativo en el número de blastómeras un día después, de manera similar la suplementación del medio de cultivo con concentraciones de 50 y 100 ng/ml de IGF-1 no afectó al desarrollo temprano del embrión. Igualmente, el IGF-I ha demostrado no tener ningún efecto sobre el embrión durante la IVM-IVF-IVC durante el periodo de transición del control maternal al control embriológico del desarrollo (Palma *et al.*, 1997).

Por otro lado, la adición del IGF-I en el medio de cultivo incrementa la proporción de ovocitos de vacuno que llegan hasta el estadio de

blastocisto (50 ng/ $\mu$ L: Sirisathien *et al.*, 2003) y a etapas avanzadas de blastocistos en los días 7 y 8 después de la fecundación, estos embriones han demostrado ser más capaces de sobrevivir después de realizarse la transferencia a las receptoras, pero el mecanismo es aún desconocido (Block *et al.*, 2007).

El IGF-I es un factor de supervivencia para los embriones preimplantacionales expuestos al shock térmico. Particularmente el IGF bloquea los efectos que tiene el estrés térmico sobre el número de células y el desarrollo a la etapa de blastocisto y previene la inducción de apoptosis en respuesta a la elevada temperatura (Jousan *et al.*, 2004). En un estudio realizado por (Lim *et al.*, 2007), observaron que la suplementación de IGF-I aumentó las tasas de preñez y el número de nacimientos en vacas lactantes, pero recientes estudios muestran que este efecto solamente ha sido observado en vacas con estrés calórico (Block *et al.*, 2007).

### **2.3. Influencia de la tensión de oxígeno sobre el desarrollo embrionario.**

Las condiciones de cultivo *in vitro* derivan de lo que ocurre *in vivo* en muchos aspectos, pero uno de los factores críticos parece ser la concentración de oxígeno en aquellos embriones de crecimiento *in vitro*. El oxígeno es tóxico para muchos tipos de células a niveles atmosféricos, probablemente debido a la formación de radicales de oxígeno. Muchos estudios han reportado mejoras en el desarrollo embrionario en cultivo usando concentraciones de oxígeno más bajas que la atmosférica, la cual es aproximadamente 21% (Thompson *et al.*, 1990). En el estudio

reportado por (Fischer y Bavister 1993) el perfil de los cambios diarios en la tensión de oxígeno no fue diferente en el oviducto y el útero. En ambos órganos, hubo un pronunciado aumento en la medición la tensión de oxígeno en el día 3, esto es entre los estadios de 8 células a mórula y la formación del blastocisto (Bavister *et al.*, 1983). Este incremento en la tensión de oxígeno desde el día 1 hasta el día 3 puede ser importante para el metabolismo embrionario durante las etapas de división temprana en oviducto y útero. Hacia el día 4, hubo una marcada caída en la tensión de oxígeno, en ambos órganos, correspondiente al tiempo cuando los blastocistos están completamente desarrollados y la implantación inicia. Los cambios paralelos en la tensión de oxígeno observados en el oviducto y útero indican que un mecanismo sistémico (endocrino) es el responsable y no alguna acción local de los embriones en crecimiento ya que todos los embriones están en el útero hacia el día 3 (Bavister, 1983) ;( Fisher *et al.* 1985) en su trabajo en conejos reporta que la tensión de oxígeno alcanza sus niveles más bajos (3.5%) cerca al tiempo en que las concentraciones de progesterona llegan a su pico que es cuando la implantación del embrión inicia. Además, reporta haber observado un aumento marcado de la tensión de oxígeno luego de la ovariectomía. La significancia funcional de una tensión intrauterina reducida en oxígeno en el momento cercano a la implantación es desconocida, pero esta podría servir para proteger la periimplantación del blastocisto de la toxicidad del oxígeno, la cual podría ser una razón para el desarrollo inferior de los embriones en cultivo *in vitro*. Muchos estudios han mostrado que el oxígeno reducido (1-10%) mejora el desarrollo de embriones cultivados de algunas especies.

En un estudio realizado con embriones de hámsteres cultivados bajo 20% O<sub>2</sub> o en oxígeno reducido (5 o 10%), ningún detrimento por altas concentraciones de oxígeno fue observado en el desarrollo hasta que el estado de blastocisto fue alcanzado (Bavister, 1990). Un marcado efecto de toxicidad por oxígeno fue observado por exposición breve (1-2h) de embriones de una célula de rata a condiciones ambientales antes de ser cultivados bajo 5% O<sub>2</sub>; la toxicidad no fue manifestada sino hasta los estadios de mórula y blastocisto, además de resaltar la sensibilidad de la preimplantación del embrión a las concentraciones de O<sub>2</sub>.

Todos estos hallazgos indican que la concentración de oxígeno debe ser considerada muy cuidadosamente en el estudio de cultivo de embriones *in vitro* y en especial en la formación de radicales de oxígeno *in vitro*. Los embriones *in vivo* podrían ser protegidos frente a los radicales libres por mecanismos tales como los recicladores de oxígeno en el fluido oviductual (Legge y Sellens, 1991). El efecto protector de recicladores como el superoxidodismutasa en el cultivo de embriones de rata ha sido demostrado por muchos investigadores (Noda *et al* 1991; Umaoka *et al.*, 1992). Estudios en el metabolismo de embriones cultivados *in vitro* podrían ser mal llevados a menos que se usen condiciones fisiológicas para la tensión de oxígeno. Por ejemplo, estudios en el rendimiento de blastocistos bajo condiciones de oxígeno atmosféricas podría conducir a embriones con un anormal comportamiento metabólico (Gott *et al.*, 1990). Es conocido que el cultivo *in vitro* tiene efectos a corto plazo, particularmente sobre la expresión de genes y el metabolismo en estado de blastocisto, mientras que el síndrome de cría grande es comúnmente

observado luego de una transferencia de embriones producidos *in vitro*. De hecho, es posible que el ambiente circundante al embrión temprano, previo a la implantación, pudiera programar el posterior desarrollo. La regulación de la expresión de genes y el metabolismo, a través de la activación de genes, esta mediado por factores de transcripción, los cuales son en sí mismos controlados por factores internos y externos (Harvey, 2007). Al respecto, el contenido de oxígeno disuelto en el fluido folicular esta negativamente correlacionado con la frecuencia de anomalías cromosómicas, blastómeras multinucleadas y defectos citoplasmáticos (Van Blerkom *et al.*, 1997). (Clark *et al.*, 2006) propone un modelo de disminución paulatina de la presión de oxígeno a medida que avanza la formación del embrión. (Harvey *et al.*, 2002) plantea, además, que los embriones humanos y bovinos, podrían establecer una gradiente significativa que lleva a la anoxia en el centro del embrión. A pesar de estas observaciones, los embriones de la mayoría de especies son cultivados en condiciones cercanas a la atmosférica (20% de oxígeno) o bajo 5% de oxígeno, ninguna presenta los cambios dinámicos en la concentración de oxígeno que si han sido encontradas *in vivo* (Harvey, 2007).

Mientras Oyadama y Fukui (2004) reportan que 20% de oxígeno durante la maduración *in vitro* en bovinos resultó en tasas divisiones y blastocistos más altas comparadas con 5% de oxígeno, Hashimoto *et al.*, (2000) reportó un desarrollo mejorado de ovocitos bovinos madurados bajo condiciones de 5% de oxígeno. Significativamente, Booth *et al.*, (2005).

Un consenso sobre la concentración de oxígeno adecuada a usar durante

la maduración *in vitro* aun no es establecido, estudios adicionales son requeridos para determinar no solamente las respuestas de desarrollo sino además los efectos sobre el metabolismo y expresión genética. Mientras tanto 20% de oxígeno permanece como la concentración comúnmente usada. Ha sido encontrado que la concentración de oxígeno *in vitro* bajo la cual el desarrollo embrionario ocurre post fertilización altera el desarrollo hasta el estado de blastocisto. El efecto negativo de la exposición a concentraciones de oxígeno atmosférico fue observado por Pabón *et al.*, (1989), posteriormente Thompson *et al.*, (1990) examinó el efecto de diferentes concentraciones de oxígeno durante el cultivo *in vitro* en embriones de ovejas y vacas y encontró que, comparado con concentraciones cercanas a 20% de oxígeno, las concentraciones reducidas mejoran el número de células, sin embargo 0% de oxígeno también mostro efectos negativos.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de estudio

La investigación se realizó en el Centro de Innovación y Producción (CIP) Quimsachata, del Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA – Puno, que se encuentra ubicada entre los distritos de Santa Lucía y Cabanillas de las provincias de Lampa y San Román en la región Puno, con una extensión de 6,281 ha, a una altitud promedio de 4300 msnm, dentro de las coordenadas 15° 44'00" Latitud Sur y 70° 41' 00" Longitud Oeste de Greenwich; donde la temperatura fluctúa entre 2°C (mayo a julio) y 15°C (setiembre a diciembre), localizado dentro de la zona agroecología denominada puna seca (SENAMHI 2012).

#### 3.2. Material de estudio

Para el estudio se diseccionaron 215 ovarios de alpacas beneficiadas en el camal de Nuñoa-Melgar- Puno seleccionándose 1051 ovocitos (categoría I y II) para la maduración y fertilización *in vitro* distribuidos en la tabla 1.

**Tabla 1: distribución de ovocitos de alpacas**

FACTORES/TENSIÓN	Nº de ovocitos
EGF 6%	205
EGF 20%	219
IGF-I 6%	206
IGF-I 20%	210
CONTROL	211
<b>TOTAL</b>	<b>1051</b>

### 3.3 Materiales.

- Micro pipetas 10uL, 100uL, 200uL, 1000 uL
- Tips 10 uL, 200 uL, 1000 uL
- Placas Petri 3.5 mm x10
- Placas multipocillo
- Porta objeto
- Láminas cubre objeto
- Mango de bisturí n°3
- Hoja de bisturí n°12
- Pinzas simples
- Algodón gasa
- Guantes
- Barbijo

#### 3.3.1. Equipos.

- Incubadora CO<sub>2</sub> /O<sub>2</sub>
- Microscopio
- Estereoscopio
- Platina térmica
- Baño maría
- Centrifuga

- Homogeneizador Vortex
- Balanza de precisión
- Cámara de flujo laminar
- Congeladora

### **3.3.2. Reactivos.**

- TCM-199
- LH
- FSH
- BSA
- Gentamicina
- Piruvato
- Amino ácidos esenciales
- Aminoácidos no esenciales
- SFB (suero fetal bovino)
- PBS (solución buffer fosfato)
- Mioinositol
- Ácido cítrico
- EGF
- IGF
- Percoll (45 %, 22.5 %)

### 3.4. METODOLOGÍA.

#### 3.4.1. Obtención y transporte de los ovarios.

En el Centro de Beneficio de Nuñoa, luego del eviscerado del animal se procedió a separar los ovarios de ambos lados del tracto reproductivo con ayuda de la tijera Mayo se diseccionaron los ovarios. En un formato se registró las características de los ovarios con y sin cuerpo lúteo de los lados derecho e izquierdo del tracto reproductivo. Los ovarios fueron transportados hacia el laboratorio aproximadamente de 10 a 11 horas de viaje. El transporte de ovarios se realizó en pequeños termos de boca ancha capaces de conservar la temperatura de las muestras que se colectaron. El medio de transporte fue solución salina (0.9% NaCl) con adición de Antibiótico (Gentamicina 10uL/mL) a temperatura de 35.0 a 37.0°C.

#### A. Colección de ovocitos.

Para la recuperación y colección de ovocitos se trabajó con la técnica de Slicing modificado o disección de los folículos de ovarios con y sin cuerpo lúteo, se realizó cortes sobre los folículos de 2 a 6 mm, con ayuda de un bisturí y luego por presión sobre aquel corte se procedió a retirar los complejo cúmulos ovocito (COCs), todo esto sobre una placa Petri cuadrículada con PBS+BSA a temperatura de 37°C los cuales se buscó bajo un estereoscopio a 20X bajo una platina térmica atemperada a 37°C.

#### B. Selección de los ovocitos.

- La localización de los ovocitos fue con ayuda de un estereoscópico a 20X incorporada a una platina térmica.

- El recojo de los ovocitos se realizó con una micro pipeta de 10 $\mu$ L
- Los ovocitos localizados se introdujeron a otra placa que contenía una gota de 3 mL de medio (PBS + BSA) una vez colectados todos los ovocitos en la gota de 3 mL, en la misma placa se colocan dos gotas más de 80  $\mu$ L de PBS + BSA para poder clasificar a los ovocitos, en una gota se les coloca a todos los ovocitos de categoría I y en la otra gota se coloca a los ovocitos de categoría II.

Se seleccionaron los ovocitos de categoría I y II tomando los siguientes criterios:

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

#### 3.4.2. Maduración *in vitro*

Los ovocitos una vez seleccionados como aptos, los de categoría I y II se colocaron en una placa Petri y fueron lavados 3 veces en micro gotas de 80 $\mu$ L del medio de maduración TCM-199 suplementado con piruvato, glutamina, estradiol, hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) factor de crecimiento epidermal (EGF), suero fetal bovino y gentamicina (**Tabla 5 Anexo A-1**); la cual fue previamente incubada 2

horas antes a 38.5°C con 5% CO<sub>2</sub> y humedad relativa (>95%) el lavado se realizó con la finalidad de acostumbrar a los ovocitos y retirar las células de granulas que están desprendidas; una vez lavados los ovocitos fueron transferidos a otra placa multipocillos que contenían 500 uL del medio de maduración y cubiertas con aceite mineral.

Seguidamente la placa multipocillos conteniendo los ovocitos y el medio de maduración fue colocado cuidadosamente dentro de la incubadora el cual se mantuvo con las condiciones de temperatura 38.5°C con 5%CO<sub>2</sub> y con una humedad relativa (>95%) durante 32 horas para su correspondiente maduración.

Para la evaluación de la maduración de los ovocitos se utilizó un estereoscopio de 20X con una platina incorporada que tiene que estar atemperada a 37°C, a la observación se observó la expulsión del primer corpúsculo polar.

### **3.4.3. Fertilización *in vitro* con semen fresco**

Para realizar fertilización *in vitro*, incluye varios procedimientos, como la colección de espermatozoides, separación espermática y capacitación espermática.

- La colección de espermatozoides se realizó con el método de maniquí con una vagina artificial, de un macho de probada fertilidad, esta vagina artificial tiene que estar atemperada a 40°C, el semen colectado fue diluido en una proporción de 1:1 con dilutor e incubado en baño maría a 37°C.

- Para la separación espermática se realizó con el método de gradiente discontinua de Percoll colocando en un tubo falcón 500 uL Percoll 45%, sobre el 500 uL de Percoll 22.5% y encima 500uL de semen; el cual fue llevado a la centrifuga a 2500rpm/10 min.
- Para la capacitación espermática el pellet formado luego de la centrifugación fue resuspendido en el medio Sperm-TALP (**Tabla 7 Anexo A-1**) suplementado con 1.0 mM piruvato de sodio, 3 mg/ml de BSA fracción V y 50µg/mL gentamicina con adición de 10uL de heparina y además se adicionó 4 uL de heparina y 30 uL de PHE/ (penicilamina, hipotaurina y epinefrina) llevado nuevamente a centrifuga a 1500 rpm/10 min. El pellet formado será re suspendido en 1mL de medio FERT – TALP.
- Fertilización *in vitro* Luego de realizar la evaluación de la maduración de los ovocitos fueron colocados en gotas de medio FERT-TALP suplementado con 0.25 mM piruvato sodio, 6mg/ml de BSA (fatty acid free) y 50µg/mL gentamicina (**Tabla 6 Anexo A-1**), que previamente fue equilibrada durante 2 horas a 38,5°C con 5%CO<sub>2</sub> y humedad (> 95%)En sincronía se realizó la capacitación espermática y se procedió a inseminar las gotas de fertilización con espermatozoides ya capacitados, los ovocitos fueron sometidos a Fertilización *in vitro* durante un periodo de 10h a 38,5°C con 5%CO<sub>2</sub> y humedad (> 95%)

#### 3.4.4. Cultivo *in vitro*.

##### a. Primer cultivo embrionario en medio KSOMaa.

Pasadas las 10 horas de fertilización los presuntos cigotos fueron pipeteados sucesivamente y lavados a través del pasaje en gotas en medio KSOMaa suplementado con  $\text{CaCl}_2+2\text{H}_2\text{O}$ , sodium lactato, sodium pyruvate, glutamina, aminoácidos esenciales, aminoácidos no esenciales, BSA y gentamicina (**Tabla 8 Anexo A-1**).

- a) Para el Grupo 1 al medio de cultivo embrionario (KSOMaa) se suplemento 100ng/ml de EGF y cultivados bajo una tensión de  $\text{O}_2$  de 6%.
- b) Para el Grupo 2 al medio de cultivo embrionario (KSOMaa) se suplemento 100ng/ml de IGF-I y cultivados bajo una tensión de  $\text{O}_2$  de 6%.
- c) Para el Grupo 3 al medio de cultivo embrionario (KSOMaa) se suplemento 100ng/ml de EGF y cultivados en alta tensión de  $\text{O}_2$  de 20%.
- d) Para el Grupo 4 al medio de cultivo embrionario (KSOMaa) se suplemento 100ng/ml de IGF-I y cultivados en alta tensión de  $\text{O}_2$  de 20%.
- e) Para Grupo 5 al medio de cultivo embrionario (KSOMaa) no se le suplemento los factores embriotròficos y cultivados en tensión de  $\text{O}_2$  de 6%.

El pasaje de los lavados se hace con la finalidad de eliminar las células del cúmulo restantes y finalmente ser cultivados en este mismo medio que fue preparado 2 horas antes y colocado en la incubadora para que establezca el

pH y la osmolaridad del medio de cultivo y para luego introducir a los cigotos, una vez colocados los cigotos en las placas multipocillos con 500 uL de medio cubiertas con aceite mineral se pasa a la incubadora por 48 horas a 38,5°C, en alta tensión de oxígeno ( 5%CO<sub>2</sub>, 20 % de oxígeno y 95% de humedad relativa) o en baja tensión de oxígeno (mezcla de 5% de CO<sub>2</sub>, 6% de oxígeno y 95% de humedad relativa). Trascorridas las 48 horas se realizó la evaluación de división celular con el estereoscopio incorporado con una platina térmica que estaba atemperada a 37 ° C.

#### **b. Segundo cultivo embrionario en medio SOFaa.**

Una vez evaluados los embriones y culminado el periodo del primer cultivo embrionario se procedió a extraer los embriones y fueron lavados a través del pasaje en gotas en medio SOFaa suplementando con MgCl<sub>2</sub>+2H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>+2H<sub>2</sub>O, piruvato, L-Glutamina, aminoácidos esenciales y no esenciales, ácido cítrico, Myo- inositol, SFB 2% y gentamicina (**Tabla 9 Anexo A-1**).

- a) Para el Grupo 1 al medio de cultivo embrionario se suplemento 100ng/ml de EGF y cultivados en baja tensión de O<sub>2</sub> de 6%
- b) Para el Grupo 2 al medio de cultivo embrionario se suplemento 100ng/ml de IGF-I y cultivados en baja tensión de O<sub>2</sub> de 6%
- c) Para el Grupo 3 al medio de cultivo embrionario se suplemento 100ng/ml de EGF y cultivados en alta tensión de O<sub>2</sub> de 20%
- d) Para el Grupo 4 al medio de cultivo embrionario se suplemento 100ng/ml de IGF-I y cultivados en alta tensión de O<sub>2</sub> de 20%
- e) Para Grupo al medio de cultivo embrionario no se suplementaron los factores embriotróficos.

Que fueron preparadas 2 horas antes; para introducir los embriones el lavado se hace con la finalidad de acostumbrar al segundo medio del cultivo embrionario y así finalmente colocarlos en las placas multipocillos que contiene ya el medio 500 uL cubiertas con aceite mineral; una vez introducidos los embriones a las placas fueron incubados 38,5°C, en alta tensión de oxígeno ( 5%CO<sub>2</sub>, 20 % de oxígeno y 95% de humedad relativa) o en baja tensión de oxígeno (mezcla de 5% de CO<sub>2</sub>, 6% de oxígeno y 95% de humedad relativa); se renovó el medio SOFaa a cada pocillo cada 48h. Finalmente se evaluó al día 7, donde se observaron los blastocistos.

#### 3.4.5. Prueba estadística.

Los datos sobre las variables en estudio para interpretar las tasas de clivaje y tasa de blastocistos se empleó la prueba estadística de Chi-cuadrado.

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

##### a. Tasa de clivaje:

X<sub>2</sub> = población observable de ovocitos fertilizados

O<sub>i</sub> = ovocitos fertilizados observados

E<sub>j</sub> = ovocitos fertilizados esperados

##### b. Tasa de blastocistos:

X<sub>2</sub> = población de ovocitos fertilizados

Oi = blastocistos observados

Ej = blastocistos esperados

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1. Tasa de clivaje post primer cultivo embrionario en KSOMaa con factores embriotróficos a diferentes tensiones de oxígeno por 48 horas.

##### 4.1.1. Tasa de clivaje por efecto del factor embriotrófico EGF a diferentes tensiones de oxígeno.

Los resultados de división celular de embriones de alpacas producidos *in vitro* cultivados en medio KSOMaa con adición de factor embriotrófico EGF y con dos tensiones de oxígeno 6% y 20%, se evidencia en la tabla 2:

**Tabla 2: Efecto del factor embriotrófico (EGF) a diferentes tensiones de oxígeno.**

Tensiones de O <sub>2</sub>	Ovocitos(n)	n (%) divisiones
6%	205	51(24.8)
20%	219	13(5.9)
Control	211	33(15.6)
<b>(P≤0.01)</b>		

En la tabla 2, se observa tasa de clivaje post primer cultivo embrionario en medio KSOMaa con adición del factor embriotrófico EGF de diferentes tensiones de oxígeno por un período de 48 horas; donde se obtuvo 24.8% con 6% de oxígeno, 5.9% con 20% de oxígeno y 15.6% de división celular en el grupo control; estos valores sometidos a la prueba de Chi- cuadrado, se encontró diferencias altamente significativas (P≤0.01).

En el presente estudio se encontró que el EGF al 6% presento mayor desarrollo embrionario respecto a los demás grupos, esto podría explicarse por el efecto

del factor embriotrófico y al 6 % de tensión de oxígeno. Investigaciones previas realizados *in vitro*, se ha encontrado que el EGF favorece la transformación del embrión hasta el estadio de blastocisto, ya que este factor embriotrófico es un polipéptido con una potente actividad mitogénica.

El grupo control presenta mayor porcentaje de clivaje que el grupo con alta tensión de oxígeno, esto explicaría que no hubo estrés oxidativo ya que fue cultivado a baja tensión de oxígeno. Y el grupo con alta tensión de oxígeno en donde el porcentaje de embriones competentes fue menor, también puede explicarse que las altas concentraciones de oxígeno (20%) serían perjudiciales para el desarrollo embrionario; debido a que, sometidos a las condiciones de alta tensión de oxígeno, favorece la producción de ROS, los cuales pueden reaccionar con los polipéptidos y lípidos de la membrana, resultando en dañar a las células por inactivación enzimática y da como resultado la muerte celular. (Leege M, et al., 1991).

Los valores encontrados son inferiores a lo que reporta Cainzos, (2012) 87.82% de tasa de clivaje bajo una tensión de oxígeno de 6% y 81.14% con alta tensión de oxígeno 20% con adición de EGF en bovinos que fueron cultivados en medio SOF por 48 horas. Igualmente, Ahumada *et al.*, (2009) en una experiencia similar en bovinos, obtiene con adición de EGF 74.15% de división celular cultivados a una baja tensión de oxígeno 5%. Esta superioridad tasa de clivaje se debe a que en el presente estudio se realizó con ovarios de alpacas recuperados de mataderos y que fueron transportados 10 a 11 horas de viaje; que podría afectar en la disminución de tasa de clivaje; a esto coadyuvan diferentes autores

atribuyendo que, el transporte de ovarios en 90 minutos es un factor que influye para la división celular.

#### 4.1.2. Tasa de clivaje por efecto del factor embriotrófico IGF-I a diferentes tensiones de oxígeno.

Los resultados de división celular de embriones de alpacas producidos *in vitro* con adición de factor embriotrófico IGF-I bajo dos tensiones de oxígeno 6% y 20%, se presenta en la tabla 3:

**Tabla 3: Efecto del factor embriotrófico (IGF-I) a diferentes tensiones de oxígeno.**

Tensiones de O <sub>2</sub>	Ovocitos(n)	n (%) divisiones
6%	206	42(20.4)
20%	210	24(11.4)
Control	211	33(15.6)
<b>(P≤0.05)</b>		

La tabla 3, muestra tasa de clivaje post primer cultivo embrionario en medio KSOMaa con adición del factor embriotrófico IGF-I a diferentes tensiones de oxígeno por un período de 48 horas; en el cual se obtuvo 20.4% de división celular con 6% de oxígeno, 11.4% con 20% de oxígeno y 15.6% en el grupo control; los mismos analizados a la prueba de Chi- cuadrado, resultaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ). Esta diferencia que se encontró en mayor porcentaje de clivaje con IGF-I y baja tensión de oxígeno (6 %). Se debería al factor embriotrófico similar a la insulina (IGF-I) que favorece en incrementar en el número de células de la masa celular interna; también podría influenciar la supervivencia de embriones directamente manifiesta (Block. 2007).

El grupo control es el segundo en presentar mayor tasa de clivaje comparado al grupo sometido a la tensión de oxígeno de 20 %, debido a que fue cultivado a baja tensión de oxígeno y no sufrió un estrés oxidativo, comparando con el IGF-I con alta tensión de oxígeno, presentó un estrés oxidativo causando un daño a nivel del cito esqueleto y el ADN. (O'Neill., 1997).

Los valores obtenidos en el presente estudio son inferiores al reporte de Palma *et al.*, (1997) quién registra tasa de clivaje de 79.3 % con IGF-I cultivado a una baja tensión de oxígeno 5% en vacunos. Mientras (Ahumada, *et al.*, 2009), en una experiencia similar en bovinos, obtuvieron división celular de 71.01 % con IGF-I cultivados al 5 % de tensión de oxígeno.

Al no existir reportes en alpacas no se realizó la discusión, por ello estos resultados son primordiales por ser primarios en este campo de conocimiento.

#### 4.1.3. Tasa de clivaje por efecto de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) bajo una tensión de oxígeno 6%.

Los resultados de división celular de embriones de alpacas producidos *in vitro* en medio KSOMaa con adición de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) cultivados a baja tensión de oxígeno 6% y por 48 horas, se muestra en la tabla 4:

**Tabla 4: Efecto de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) con 6% de oxígeno.**

Factores embriotróficos	Ovocitos(n)	n (%) divisiones
EGF	205	51(24.8)
IGF-I	206	42(20.4)
Control	211	33(15.6)
		<b>(P≥0.05)</b>

La tabla 4, muestra tasa de clivaje post primer cultivo embrionario en medio KSOMaa con adición de los factores embriotróficos EGF e IGF-I a baja tensión de oxígeno por un período de 48 horas; en el cual la tasa fue de 24.8% con EGF, 20.4% con IGF-I y 15.6 % en el grupo control ( $P \geq 0.05$ ). Esta semejanza es debido a que, ambos factores embriotróficos tienen acción similar sobre el porcentaje de división celular.

En una experiencia similar (Ahumada, *et al.*, 2009), reporta 74.15% de división celular en bovinos con adición de EGF y con IGF obtuvo 71.01% de división celular cultivados a una baja tensión de oxígeno 5%; comparado a los resultados del presente estudio fue muy superior, diferencia que se debería al factor especie, momento de colección de ovocitos; ya que estos factores embriotróficos se utilizaron en ambos trabajos de investigación porque juegan un papel esencial para regular los procesos de mitogénesis, diferenciación, metabolismo y apoptosis (Block. *et al.*, 2007).

#### 4.1.4. Tasa de clivaje por efecto de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) alta tensión de oxígeno 20%.

Los resultados de división celular de embriones de alpacas producidos *in vitro* con adición de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) cultivados al 20 % de tensión de oxígeno 20% por 48 horas, se presenta en la tabla 5:

**Tabla 5: Efecto de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) con 20% de oxígeno.**

Factores embriotróficos	Ovocitos(n)	n (%) divisiones
EGF	219	13(5.9)
IGF-I	210	24(11.4)
Control	211	33(15.6)
<b>(<math>P \leq 0.01</math>).</b>		

En la tabla 5, se evidencia la tasa de clivaje post primer cultivo embrionario en medio KSOMaa con adición de los factores embriotróficos EGF e IGF-I en alta tensión de oxígeno por un período de 48 horas; donde se obtuvo el 5.9% con EGF, 11.4% con IGF-I y en el control se obtuvo 15.6% de división celular; estos a la prueba de Chi- cuadrado, mostraron diferencia altamente significativa ( $P \leq 0.01$ ). Esta diferencia se debe a que, el grupo control es quien presenta mayor porcentaje en clivaje, esto debido a que, fue cultivado a baja tensión de oxígeno y no sufrió un estrés oxidativo comparado con los dos grupos que contienen los factores embriotróficos que si sufrieron el estrés oxidativo; IGF-I es el segundo en presentar mayor porcentaje en clivaje; esto se debe por los efectos sobre el embrión son mediados por la acción directa de IGF-I, lo cual es apoyado por la presencia de receptores de IGF-I sobre el embrión. (Daftary y Gore., 2005)

La no existencia de literatura sobre tasa de clivaje con factores embriotróficos con 20% de oxígeno, no se realiza la discusión respectiva; es por tal motivo los valores obtenidos son reportes primarios para la difusión.

**4.2. Tasa de blastocistos post 7 días del segundo cultivo embrionario en medio SOFaa con factores embriotróficos a diferentes tensiones de oxígeno.**

**4.2.1. Tasa de blastocistos por efecto del factor embriotrófico EGF a diferentes tensiones de oxígeno.**

Los resultados de blastocistos de alpacas producidos *in vitro* con adición de factor embriotrófico EGF con dos tensiones de oxígeno 6% y 20% por 48 horas, se muestra en la tabla 6:

**Tabla 6: Efecto del factor embriotrófico (EGF) a diferentes tensiones de oxígeno.**

Tensiones O <sub>2</sub>	Ovocitos(n)	n (%) blastocistos
6%	205	29(14.1)
20%	219	12(5.5)
Control	211	6(2.8)
<b>(P ≤ 0.01)</b>		

En la tabla 6, se observa tasa de blastocistos en el segundo cultivo embrionario SOFaa con adición del factor embriotrófico EGF a diferentes tensiones de oxígeno; donde en el día 7, se encontró 14.1% de blastocistos desarrollados con 6% de oxígeno, 5.5% con 20% de oxígeno y 2.8% para el control; estos valores contrastados a la prueba de Chi- cuadrado, resultó diferencia altamente significativa ( $P \leq 0.01$ ).

El valor encontrado en este trabajo con el factor embriotrófico EGF a una baja tensión de oxígeno 6% mostró mayor tasa de blastocistos respecto a los dos grupos, esto podría explicarse que, la baja tensión de oxígeno es favorable para el desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto, lo que podría estar asociado a la disminución de la producción de ROS, lo que se da con altas tensiones de oxígeno; respecto con el grupo control, la tasa de blastocisto es bastante bajo, esto es por no recibir la adición del embriotrófico que es muy importante para el desarrollo embrionario.

Los valores encontrados en este estudio son inferiores al reporte de Caizon, (2012) donde reporta 29.09% de tasa de blastocisto bajo una tensión de oxígeno 6% y 24.76% con alta tensión de oxígeno 20% en vacunos que fueron cultivados en medio SOFaa por 48 horas. Mientras Ahumada *et al.*, (2009) en

una experiencia similar en vacunos, obtuvo 18.54% de tasa de blastocisto con adición de 10 ng/mL EGF o cultivados bajo una tención de oxígeno 5%.

#### 4.2.2. Tasa de blastocistos por efecto del factor embriotrófico IGF-I a diferentes tensiones de oxígeno.

Los resultados de blastocistos de alpacas producidos *in vitro* con adición de factor embriotrófico IGF-I con dos tensiones de oxígeno 6% y 20%, se muestra en la tabla 7:

**Tabla 7: Efecto del factor embriotrófico (IGF-I) a diferentes tensiones de oxígeno.**

Tensiones O <sub>2</sub>	Ovocitos(n)	n (%) blastocistos
6%	206	38(18.4)
20%	210	14(6.6)
Control	211	6(2.8)
<b>(P ≤ 0.01)</b>		

En la tabla 7, se observa la tasa de blastocistos en el segundo cultivo embrionario SOFaa con adición del factor embriotrófico IGF-I a diferentes tensiones de oxígeno; en el cual en el día 7, fue 18.4% al 6% de oxígeno, 6.6% al 20% de oxígeno y 2.8% de blastocistos desarrollados para el grupo control; valores sometidos a la prueba de Chi- cuadrado, resultó diferencias altamente significativa ( $P \leq 0.01$ ), por efecto de tensión de oxígeno en la variación del porcentaje de blastocistos desarrollados.

En los resultados se encontró que el factor embriotrófico IGF-I al 6% de oxígeno presento mayor tasa de blastocisto, comparado con el grupo de alta tensión de oxígeno 20%, esto podría explicarse que el factor embriotrófico y la baja tensión de oxígeno es favorable en el desarrollo

embrionario. Adicionalmente, las altas tensiones de oxígeno, hay producción de ROS, que también se conoce que en los embriones producidos *in vitro* en tensiones altas 20% hay acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las blastomeras, lo que ocasiona muerte celular por apoptosis (Block, 2007). Respecto con el grupo control es el que presenta más bajo en porcentaje de blastocisto, esto a falta del factor embriotrófico es importante para el desarrollo embrionario.

Los resultados mostrados en la tabla 7, con el grupo de 6% de oxígeno del estudio son inferiores comparados con Palma, (1999), quien obtuvo una tasa de blastocisto en vacunos de 40.9% en 48 horas y con tensión de 5% de oxígeno. Mientras, los resultados del presente estudio son superiores a lo reportado por Ahumada *et al.*, (2009), 11.54% quien realizó en vacunos y una tensión de oxígeno de 5%.

#### 4.2.3. Tasa de blastocistos por efecto de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) bajo una tensión de oxígeno 6%.

Los resultados de blastocistos de alpacas producidos *in vitro* con adición de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) cultivados a baja tensión de oxígeno 6%, se presenta en la tabla 8:

**Tabla 8: Efecto de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) con 6% de oxígeno.**

Factores embriotróficos	Ovocitos(n)	n (%) blastocistos
EGF	205	29(14.1)
IGF-I	206	38(18.4)
Control	211	6(2.8)

**(P ≤ 0.01)**

En la tabla 8, se observa tasa de blastocistos en el segundo cultivo embrionario SOFaa con adición de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) y a una baja de tensión de oxígeno (6 %), donde se evaluó en el día 7, 14.1% con EGF, 18.4% con IGF-I% y 2.8% de blastocistos desarrollados en el grupo control; los mismos contratados a la prueba de Chi- cuadrado, mostraron diferencia altamente significativa ( $P \leq 0.01$ ).

En este trabajo se encontró que el factor embriotrófico IGF-I presento mayor tasa de blastocistos respecto a los grupos EGF y control. Estos resultados nos indican que el factor embriotrófico es muy favorable para el desarrollo embrionario y cultivado en baja tensión de oxígeno.

En una experiencia similar en bovinos, donde obtuvieron con adición de EGF 18.42 % de tasa de blastocistos y con respecto a IGF 11.56%

cultivados al 5 % de tensión de oxígeno (Ahumada, *et al.*, 2009). Al comparar estos estudios con la presente investigación, se evidencia que, con el factor embriotrófico EGF los valores obtenidos son inferiores pero superior al del IGF-I.

#### 4.2.4. Tasa de blastocistos por efecto de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) alta tensión de oxígeno 20%.

Los resultados de blastocistos de alpacas producidos *in vitro* con adición de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) alta tensión de oxígeno 20%, se presenta en la tabla 9:

**Tabla 9: Efecto de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) con 20% de oxígeno.**

Factores embriotróficos	Ovocitos(n)	n (%) blastocistos
EGF	205	12(5.5)
IGF-I	206	14(6.7)
Control	211	6(2.8)
<b>(P ≥ 0.05)</b>		

La tabla 9, presenta tasa de blastocistos en el segundo cultivo embrionario SOFaa con adición de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) con 20 % de tensión de oxígeno; en donde hasta el día 7, fue de 5.5% con EGF, 6.7% con IGF-I y 2.8% para el control, resultados sometidos a la prueba de Chi- cuadrado, no mostraron diferencia significativa ( $P \geq 0.05$ ).

Los porcentajes bajos de tasa de blastocisto con adición de los factores embriotróficos, se debería que las altas tensiones de oxígeno (20%), influye a ocurrir un estrés celular mayor donde no realizaron su función adecuadamente por la producción de ROS.

La no existencia de literatura sobre tasa de blastocisto con los factores embriotróficos con alta tensión de oxígeno 20 %, no nos permite realizar la discusión; por tal motivo los valores obtenidos son primordiales para su difusión.

## V. CONCLUSIONES

- Tasa de clivaje *in vitro* de los ovocitos de alpacas cultivados en medio KSOMaa con adición de factores embriotróficos (EGF e IGF-I) fueron favorables a baja tensión de oxígeno (6%).
- El porcentaje de blastocistos desarrollados *in vitro* en medio SOFaa con adición de los factores embriotróficos (EGF e IGF-I) fueron favorables a baja tensión de oxígeno (6%).

## VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar la adición de los factores embriotróficos en los medios de cultivo embrionario a una baja tensión de oxígeno para el desarrollo embrionario en alpacas.
- Se recomienda estudiar el mecanismo de acción de los factores embriotróficos en el cultivo embrionario *in vitro* en alpacas

## VII. REFERENCIAS

- Adams, G. (1999). Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. J. Reprod. Fertil. Suppl54: 17-32.
- Adams G, and M. Ratto 2001. Reproductive biotechnology in South American camelids.RevInvVet, Perú Supl 1:134-141
- Ahumada, C., Silvestre, M. y salvador, I. (2009). Efecto de diferentes factores de crecimiento en el medio de cultivo sobre el desarrollo y la calidad de embriones de bovino producidos in vitro en grupos reducidos. Rev. Inv. Master UPDV España.
- Alberio, y Palma, G.A. (1998). Development of bovine oocytes matured in a defined medium supplemented with a low concentration of rhFSH. Teriogenology, 49,195.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2004). La célula omega 4 ed.
- Arriaga, I., W. Huanca, M. Terreros, J. Becerra, P. Garcia, y A. Ampuero. 2014. Efecto de temperatura y tiempo de almacenamiento de ovarios de Alpacas sobre la tasa de maduración y división *in vitro* de ovocitos. Inv Vet Perú 2014; 25(4) 477-486.
- Ayuque, A., Justiniano, E., Mendoza, J., Landeo, L.y Ruiz, J. (2014). Efecto del tiempo de maduración *in vitro* en la capacidad meiotica y desarrollo de embriones de llama. Spervna. 201; 4(1). 99 – 101.

- Bavister B, Liebfried M, Lieberman G 1983. Developmente of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol Reprod* 28:235-247.
- Betts, D. y King, W. (2001). Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology*. 55:171-191.
- Bevers MM (1997): follicular wall maintains meiotic arrest in bovine oocyte cultured *in vitro*. *Mol reprod Dev* 39: 162-165.
- Benavides, L., Huanca, W., Quintanilla., Lisbeth. (2012). Efecto del método de colección y tensión de oxígeno sobre el desarrollo de ovocitos bovinos fecundación y cultivos *in vitro*.
- Bilby, T.R.; Sozzi, A.; López, M.M. et al. Pregnancy, bovine somatotropin, and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: 1. on survival of *in vitro* produced embryos following transfer to lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.67, p.1518-1529, 2006.
- Block, J., Drost, M., Monson, RL. Rutledge, JJ. Rivera, RM., Lopes, FF., Ocon, OM., Krininger, CE. Liu, J. y Hansen, PJ. (2003). Use of insulin-like growth factor-I during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase pregnancy rates following the transfer of *in vitro*-produced embryos to heat-stressed, lactating cows. *Journal of animal science*. 81:1590-1602.
- Block, J. (2007). Use of insulin growth factor-I to improve post-transfer survival of bovine embryos produced *in vitro*. *Theriogenology*. 68:49-55.

- Booth, P., Holm, P. y Callesen, H. (2005). The effect of oxygen tension on porcine embryonic development is dependent on embryo type. *Theriogenology* 63:2040–2052.
- Brackett, B. G., y Zuelke, K. A. (1993). Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*. Vol. 39, pp. 43-64.
- Cainzos, J. (2012). Diseño de un medio definido para la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos en baja tensión de oxígeno. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Clark, A., Stokes, Y., Lane, M. y Thompson, J. (2006). Mathematical modelling of oxygen concentration in bovine and murine cumulus–oocyte complexes. *Reproduction* 131: 999–1006.
- Conde, P. A., C. Herrera, V. L. Trasorras, S. Giuliano, A. Director, M. H. Miragaya, M. G. Chaves, M. I. Carchi, D. Stivale, C. Quintans, C. A. Agüero, B. Rutter, and S. Pasqualini. 2008. In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Animal Reproduction Science*. 109, 298 – 308.
- Daftary, S.S.; Gore, A.C. IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. *Experimental Biology and Medicine*, v.230, p.292-306, 2005.
- Del Campo, M., Del Campo, C., Donoso, M., Berland, M. y Mapletoft, R. (1994). In vitro fertilization and development of llama oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Therioge*.

- Ding, J., N. Clarke, T. Nagai, y R.M. Moor. 1992. Protein and nuclear changes in pig eggs at fertilization. *Mol Reprod Dev* . 31: 287-296.
- Feng, P., Knecht, M., y Catt K.J. (1987). Hormonal control of epidermal growth factor receptors by gonadotropins during granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 120:1121-1126.
- Filipiak, Y., y Larocca, C. (2010). Fertilización *in vitro* en bovinos. Manual teórico-práctico. Área de biotecnología de la reproducción Animal. Facultad de Medicina veterinaria. Universidad de la República Montevideo, República Oriental del Uruguay.
- Fischer B. (1985). Oxygen tensión in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility* 99:673-679.
- Freshney, R. (2005). Culture of animal cells. Fifth edition. New jersey: ediciones Wiley-Liss, 642p. ISBN 100471453293.
- Fry, R., Niall, E., Simpson, T., Squires, T. y Reynolds, J. (1997). The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology* 47: 977-987.
- Gandhi, AP., Lane, M., Gardener, DK. Y Krisher, RL. (2000). A single medium supports development of bovine embryo throughout maturation, fertilization and culture. *Human reprod*, 15(2):395-401.
- Gardón, M. 1999. Utilización de antisuero H-Y para sexar embriones bovinos en diferentes estadios del desarrollo embrionario, obtenidos por fertilización *in vitro*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.

- Giuliano, S., Carretero, M., Gambarotta, M., Neild, D., Trasorras, V., Pinto, M. y Miragaya, M. (2010). Improof llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Anim. Reprod. Sci.* 118 (1), 98-102.
- Glied, DW., Rosenkrans, CF., Rorie, RW. Y Rakes, JM. (1996). Effects of oocyte maturation length, sperm capacitation time, and heparin on bovine embryo developmen. *Journal of Dairy Science* Vol 79(4).
- Gluckman, L. (1994). The role of pituitary hormones, growth factors and insulin in the regulation of fetal growth. In Clarke, J.R. (ed.), *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Vol. 8. Oxford University Press, Oxford, pp. 1-60.
- Gomez, E. y Diez, C. (2002): effects of glucose and protein sources on bovine embryo development in vitro. *Anim reprod sci.* 58:23-37.
- González, R., Soto-Belloso, E., Delgado, N., Portillo, G., Ondiz, A y Velarde, J. (1992): Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos de ovarios de bovinos mestizos sacrificados. *Revista Científica- LUZ*11-13.
- Gordon, I. (1994). *Laboratory production of cattle embryos*. Wallinford, Oxon UK: CAB International.
- Gordon, I. y K.H. Lu. (1990). Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology* 33:77-87.
- Gott, AL., Hardy, R., Winston, R. y Léese, H. (1990). Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Human Reproduction* 5: 104-108.

- Hamano, S., and M. Kuwayama. 1993. In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*. Vol. 39, pp. 703-712.
- Hardy, K. y Spanos, S. (2002). Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *Journal of endocrinology*. 172:221-236.
- Harper, KM. y Brackett, BG. (1993). Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Boil reprod* 48: 409- 416.
- Harvey, A., Kind, K., Pantaleon, M., Armstrong, D. y Thompson, J. (2004). Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biol. Reprod.* 71: 1108–1119.
- Harvey, A., Kind, K. y Thompson, J. (2002). REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction* 123: 479–486.
- Harvey, A. (2007). The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Animal Reproduction Science* 98: 113-128.
- Hashimoto, S., Minami, N., Takakura, R., Yamada, M., Imai, H. y Kashima, N. (2000). Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus–oocyte complexes. *Mol. Reprod. Dev.* 57: 353–360.

- Herrera, L. y Jara, O. (2009). Comparación de dos suplementos para maduración de ovocitos ovinos in vitro. Tesis. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de la Valle. Bogotá.
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. 1999. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*. 52:683-700.
- Hooper, K., Lane, M. y Gardner, D. (2001). Reduced oxygen concentration increases mouse embryo development and oxidative metabolism. *Theriogenology* 55: 334.
- Huanca, W., Condori, R., Cainzos, J., Chileno, M., Quintela, L., Becerra, J. y Herradon, PG. (2009). In vitro maturation and in vitro fertilization of alpaca (*Vicugna pacos*) oocytes: effect of time of incubation on nuclear maturation and cleavage. *Reproduction, Fertility and Development* 2009; 22(1): 327–327. Reunión Científica Anual – APPA. Trujillo – Perú. Pp. 135-39.
- Huanca, W. (2012). Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos como alternativas para la mejora genética VI Congreso Internacional de Ganadería de Doble Propósito – XVI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal.
- Huanca, W., Palomino, J., Cervantes, M., Cordero, A. y Huanca, T. (2007). Efecto de temperatura de transporte (35° y 4°C) sobre la calidad morfológica de ovocitos colectados desde ovarios de camal. *Procc. XX Reunión ALPA y XXX Reunión APPA- Cusco, Perú.*

- Huanca, W., Condori, R., Chileno, M., Cainzos, J., Becerra, J., Quintela, L. y Herradon. PG. (2010). In vivo maturation and in vitro fertilization of alpaca oocytes. *Reproduction, Fertility and Development* 23(1) 204-205.
- Huanca, W., Condori, R., Chileno, M., Garcia, P., Cainzo, J. y Becerra, J. (2014). Evaluación de cuatro tiempos de cultivo sobre la tasa de maduración y división postfecundación *in vitro* de ovocitos de alpaca *Rev Inv Vet Perú* 2014; 25 (4): 468 – 476.
- IV CENAGRO. (2013). Censo Nacional Agropecuario. Instituto Nacional de Estadística e Informática, Lima Perú.
- Iwasaki, S., Hamano, S., Kuwayama, M., Yamashita, M., Ushijima, H., Nagaoka, S. y Nakahara, T. (1992). Developmental changes in the incidence of chromosome anomalies of bovine embryos fertilized in vitro. *J Exp Zool* 261:79-85
- INCAGRO, (2007). Informe de instituciones de unidades experimentales de los bofedales de puna seca y húmeda. Puno – Perú.
- Jousan, FE. Y Hansen, PJ. (2004). Insulin-like growth factor-I as survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biology of reproduction*. 71:1665-1670.
- Kane, M., Morgan, P. y Coonan, C. (1997). Peptide growth factors and preimplantation development, *Human Reproducción*, 3:137-157.

- Katska, L., Kauffold, P., Smorag, Z., Duschinski, V., Torner, H. y Kanitz, W. (1989). Influence of hardening of the zona pellucida on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 32:767-777.
- Khurana, N. y Wales, R. (1989). Effects of oxygen concentration on the metabolism of [U- 14C] glucose by mouse morulae and early blastocysts *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.* 1:99-106.
- Kitagawa, Y., Suzuki, K., Yoneda, A. y Watanabe, T. (2004). Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* 62, 1186- 1197.
- Léese H. 1998. Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Human Reproduction* 5: 104-108.
- Legge, M. y Sellens, M. (1991). Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. *Human Reproduction* 6: 867-871.
- Lenz, M.I.; Ramírez, G.F.; Uribe, L.F. Papel del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-I) en la regulación de la función ovárica. *Biosalud*, v.6, p.149-159, 2007.
- Lim, JM., Mei, Y., Chen, B., Godke, RA. Y Hansel, W. (1999). Development of bovine IVF oocytes cultured in medium supplemented with a nitric oxide scavenger or inhibitor in a co-culture system. *Theriogenology* 51:941-9.

- Lim, K., Jang, G., Ko, K., Lee, W., Park, H., Kim, J., Lee, S., Hwang, W., Lee, B. y Kang, S. (2007). Improved *in vitro* bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology*. 67:293-302.
- Lim, KT., lee, BC., Kang, SK. Y Hwang, WS. (2003): Effects of protein source and energy substrates on the *in vitro* development of bovine embryos in a two-step culture system. *J vet Sci* 4 (1):73-138.
- Lima, P.F.; Oliveira, L.A.; Santos, M.H. et al. Effect of retinoids and growth factor on *in vitro* bovine embryos produced under chemically defined conditions. *Animal Reproduction Science*, v.95, p.184-192, 2006.
- Lonergan, P. y Fair, T. (2008). *In vitro*-produced bovine Embryos-Dealing with the warts. *Theriogenology*. 69:17-22.
- Lonergan, P., Vergos, E., Kinis, A., Sharif, H. y Gordon, I. (1991). The effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for IVM. *Theriogenology* 35:231.
- Lowe, W. (1991). Biological actions of the insulin-like growth factors. *Insuline-like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects*. CRC Press, Boca Raton, pp. 49-95.
- Nagao, Y., Saeki, K., Hoshi, H. y Kainuma, H. (1994). Effects of oxygen concentration and oviductal epithelial tissue on the development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cultured in protein-free medium. *Theriogenology* 41, 681–687.

- Nissley P, Kiess W, Sklar M. 1993. Developmental expression of the IGF-II/mannose 6-phosphate receptor. *Molecular reproduction development*. 35: 408-413.
- Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi K, Kishi J, Mori .1991. Involvement of Superoxide radicals in the mouse two-cell block *Molecular. Reproduction and Development* 28: 356-360.
- Novoa, C. 1999. Fisiología de la reproducción de la hembra; In: Fernández-Baca S. editor. *Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos*. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago de Chile.
- O'Neill. (1997). Evidence for the requirement of autocrina growth factors for development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Biology of reproduction*. 56:229-237.
- Oyamada, T. y Fukui, Y. (2004). Oxygen tensión and medium supplements for *in vitro* maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J. Reprod. Dev.* 50, 107–117.
- Pabon, E., Findley, W. y Gibbons, W. (1989). The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil. Steril.* 51, 896–900.
- Palma, G., Muller, M. y Brem, G. (1997). Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*. *Journal of reproduction and fertility*. 110:347-353.

- Palma, G. (2001). Biología reproductiva. Ediciones Instituto nacional de Tecnología Agropecuaria. 1° edición Argentina 362 – 364.
- Paria, BC. Y Dey, SK. (1990). Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Developmental biology*. 87:4756-4760.
- Parrish, JJ., Parrish-susko, J., Winer, M. y First, NL. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of reproduction*. 38:1171-1180.
- Parrish, JJ., susko- parrish, JL., Leibfried-rutiedge, ML., Cristr, ES., Eyestone, WH. Y First, NL. (1986). Bovine *in vitro* fertilization with frozen- thawed semen. *Theriogenology* 25: 591-600.
- Pinyopummintr, T. y Bavister, BD. (1996). Effects of amino acidis on development *in vitro* of cleavage-stage bovine embryos into blastocysts. *Reprod Fertil Dev* 8:835-841.
- Poole, EM., Richardson, ME. Y Baird, WV. (1995). The effects of EGF, IGF-I and PDGF-alpha on the ability of the bovine embryo to circumvent the 8-cell developmental block *in vitro*. *Journal of animal science* 73 (Supl. 1), 221.
- Ratto, M., Berland, M., Huanca, W., Singh, J. y Adams, G. (2005). *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes. *Theriogenology* 63, 2445-2457.
- Rose, TA. Y Bavister, BD. (1992). Effect of oocyte maturation medium on *in vitro* development of in vitro fertilized bovine embryos. *Mol. Reprod. Develop.* Vol. 31, pp. 72-77.

- Ruiz, J. y L. Landeo. 2014. Avances y Perspectivas de las Fecundación *in vitro* en Camélidos Sudamericanos. Revista de Ciencias Veterinarias. Vol. 30 N° 4 2014, Lima – Perú.
- Sansinema, M., S. Taylor, P. Taylor, E. Schmidt, R. Denniston, and R. Godke. 2007. *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. Animal Reproduction Science. 99: 342-353.
- Sagirkaya, H., Misirlioglu, M., Kaya, A., First, NL., Parrish, JJ. Y Memili, E. (2007). Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. Anim reprod Sci 101:225-240.
- Sánchez, N., Sepulveda, P., Peña, E. y Miska, W. (2016). Migration/sedimentation sperm selection method used in bovine *in vitro* fertilization: comparación with washing/centrifugation theriology. Vol. 46, pp 65-73.
- Sato, A. y Montoya, L. (1990). Aparato reproductor de la alpaca (*Lama pacos*), Anatomía macroscópica. Rev. Camélidos Sudamericanos. 7, 13.
- Semenza, G. (2000). Expression of 72olució-inducible factor 1: mechanisms and consequences. Biochem. Pharmacol. 59, 47–53.
- SENAMHI .2012. Dirección Regional Puno. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología. Perú.

- Seneda, MM., Esper, CR., Garcia, JM., Olivera,JA. Y Vantini, R. (2001). Relationship between follicle size andultrasound-guided transvaginal recovery. Anim Reprod Sci. 67, 37-43.
- Sirad, MA., Dufort, I., Coenen, K., Tremblay, K., Massicitte, L. y Robert, C. (2003). The use of genomics and proteomics to understand oocyte and proteomics to understand oocyte and early embryo fuctions in farm animals. Reprod Suppl 61:117-129.
- Sirisathien, S., Hernandez-Fonseca, H. y Brackett, B. (2003). Influences of epidermal growth factor and insulin'like growth Factor-I on bovine blastocyst development *in vitro*. Animal reproduction science. 77: 21-32.
- Steeves TE y Gardner DK (1999): temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. Biol. Reprod 61: 731-740.
- Stefanello, J.R.; Barreta, M.E.; Porciuncula, P.M. et al. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. Theriogenology, v.66, p.2068-2076, 2006.
- Tervit, HR., Whittingham, DG. Y Rowson, LEA. (1972). Successful culture in vitro sheep and cattle ova. J Reprod Fertil; 30:493–7.
- Thompson, J., Simpson, A., Pugh, P., Donnelley, P, y Tervit, H. (1990). Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. J. Reprod. Fertil. 89, 573–578.

- Umaoka Y, Noda Y, Narimoto, Mori. 1992. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos *Molecular Reproduction and Development* 31: 28-33.
- Van Blerkom, J., Antczak, M. y Schrader, R. (1997). The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum. Reprod.* 12, 1047–1055.
- Van Soom, A., Yuan, Y., Peelman, L., de Matos, D., Dewulf, J., Laevens, H. y de Kruif, A. (2002). Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen solution with or without cysteine addition. *Theriogenology* 57, 1453–1465.
- Yuan, YQ., Van Soom, A., Laevens, H., Coopman, F., Peelman, LJ. Y de Kruif, A. (2000). Single embryo culture affects hatching rate in bovine *in vitro*-produced embryos. *Theriogenology* 53:307.

# ANEXOS

**A-1**

# **PREPARACIÓN DE MEDIOS**

**Tabla 10:** (PBS) Solución buffer fosfato (stock)

<b>Agua ultra-pura</b>	<b>500mL.</b>
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.0660 gr.
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.0600 gr.
NaCl	4.0000 gr.
KCl	0.1000 gr.
Na <sub>2</sub> Hpo <sub>4</sub>	0.5750 gr.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1000 gr.
Glucosa	0.5000 gr.
Piruvato de Na	0.0180 gr.
BSA	1.000 gr.
ATB	5 mL.

Se preparó para 10 mL.

**Tabla 11:** Medio de maduración TCM-199

<b>COMPOSICIÓN</b>	<b>VOLUMEN</b>
L-Glutamine solution	20 uL
Sodium pyruvate	60 uL
SFB	1000 uL
Gentamicina	50 uL
<b>FILTRAR</b>	
estradiol	10 uL
LH	10 uL
FSH	10 L

**Filtre:** Con filtros de 0.22um

**Guarde:** Inmediatamente en el incubador.

**Tabla 12:** Medio de FERT-TALP de trabajo.

<b>Solución de FERT-TALP</b>	<b>Volumen</b>
MgCl <sub>2</sub> +2H <sub>2</sub> O	234 uL
CaCl <sub>2</sub> +2H <sub>2</sub> O	204 uL
Sodium LD-lactate	18.7 uL
Sodium pyruvate	25 uL
BSA	0.06 g
heparina	10 uL
Gentamicina	10 uL

**Tabla 13:** Medio de TALP-SPERM solución de trabajo

<b>Solución de TALP-SPERM-STOCK</b>	<b>Volumen</b>
Mgcl <sub>2</sub> +2H <sub>2</sub> O	234 uL
CaCl <sub>2</sub> +2H <sub>2</sub> O	204 uL
Sodium LD-lactate	18.7 uL
<b>Composición</b>	
Sodium pyruvate	25 uL
BSA	0.03 g
gentamicina	10 uL

**Filtre:** Con filtros de 0.22um.

**Guarde:** Inmediatamente en la incubadora.

Se preparó para 10 mL

**Tabla 14:** Medio de cultivo para primer cultivo embrionario KSOM.

<b>Solución KSOM – STOCK</b>	<b>Volumen</b>
CaCl <sub>2</sub> +2H <sub>2</sub> O	200 uL
Sodium LD-lactate	10uL
<b>Composición</b>	
Sodium pyruvate	40 uL
L-Glutamine solution	27 uL
BSA	0.06 g
IGF-I	10 uL
EGF	10 uL
Aminoácidos esenciales	200 uL
Aminoácidos no esenciales	100 uL
EDTA	10 uL
Gentamicina	50 uL
<b>Agregar: EGF o IGF-I para cada tratamiento.</b>	
EGF	10 uL
IGF-I	10 uL

**Filtre:** Con filtros de 0.22um.

**Guarde:** Inmediatamente en la incubadora.

Se preparó para 10 mL

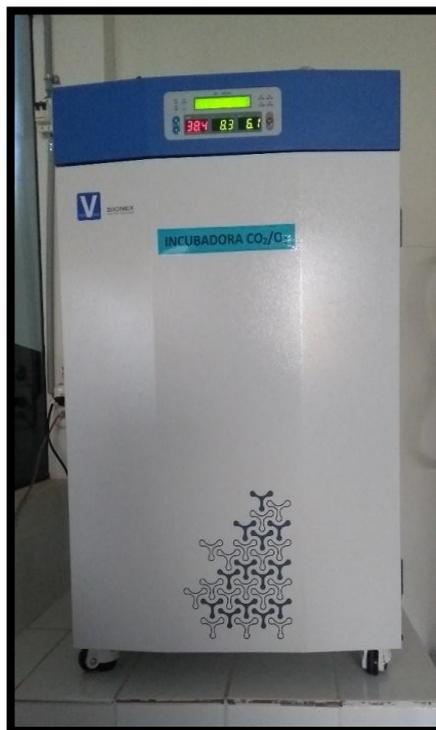
**Tabla 15:** Medio de cultivo para el segundo cultivo embrionario SOF.

<b>Solución SOF-STOCK</b>	<b>Volumen</b>
MgCl <sub>2</sub> +2H <sub>2</sub> O	136.8 uL
CaCl <sub>2</sub> +2H <sub>2</sub> O	200 uL
Sodium LD-lactate	10uL
<b>Composición</b>	
Sodium pyruvate	40 uL
L-Glutamine solution	27 uL
BSA	0.06 g
Amino ácidos esenciales	200 uL
<b>Amino ácidos esenciales</b>	100 uL
<b>Ácido cítrico</b>	10 uL
<b>Myo- inositol</b>	100 uL
<b>Agregar: EGF o IGF-I para cada tratamiento.</b>	
EGF	10 uL
IGF-I	10 uL

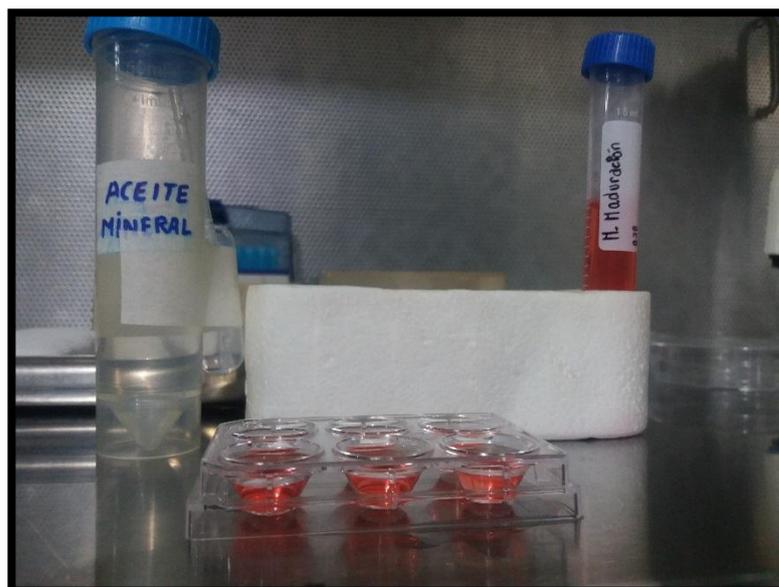
**Filtre:** Con filtros de 0.22um.

**Guarde:** Inmediatamente en la incubadora.

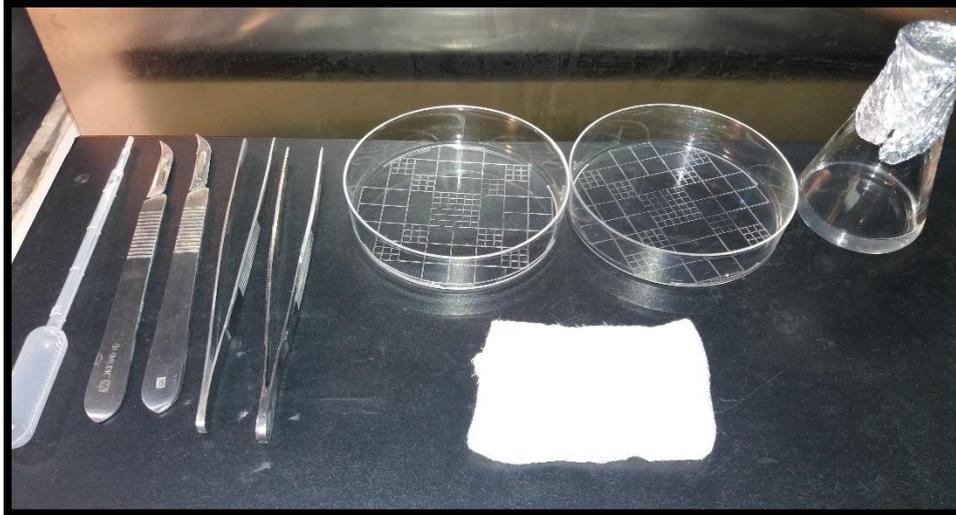
## EQUIPOS Y MATERIALES



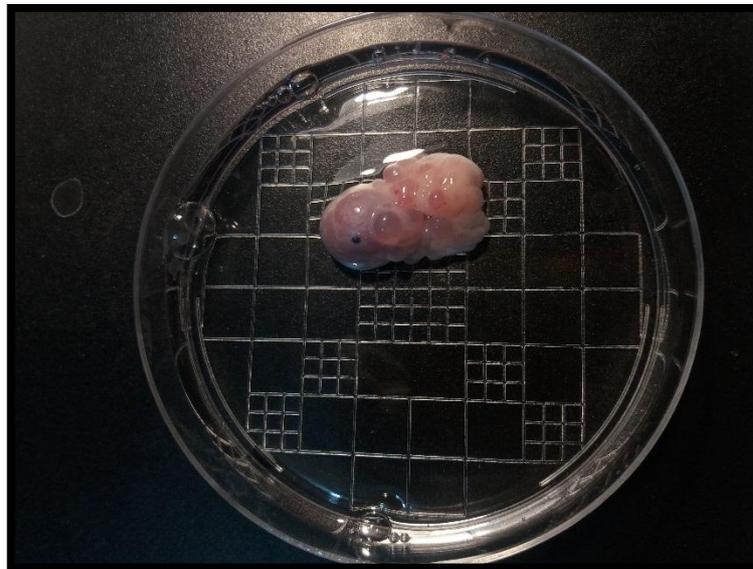
**FIGURA 1:** *Incubadora con cámara de CO<sub>2</sub> para cultivo embrionarios*



**FIGURA 2:** *Placa multipocillos con medio de maduración cubiertas con aceite mineral.*



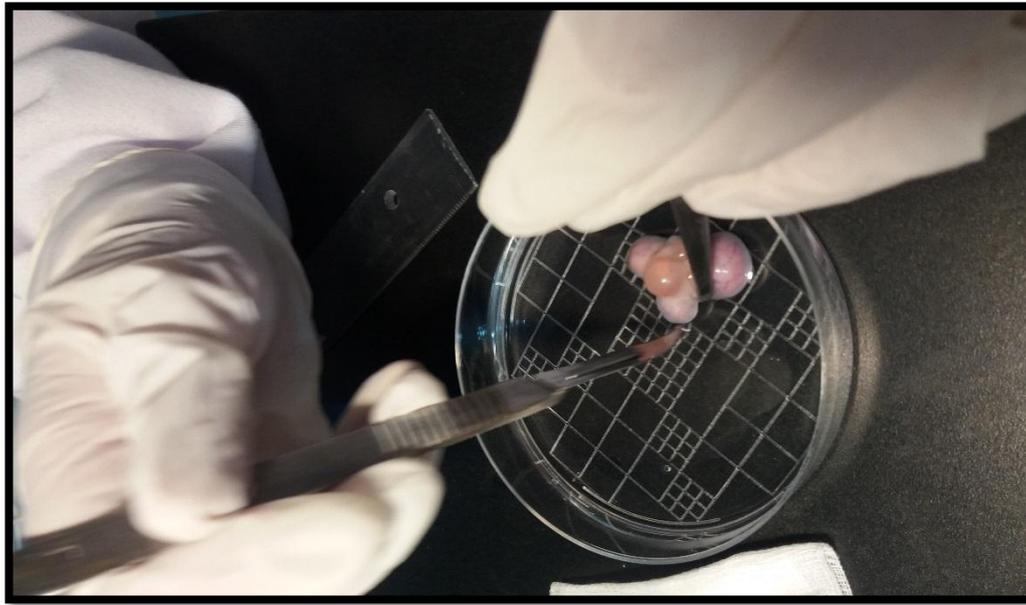
**FIGURA 3:** Pipeta Pasteur, mango de bisturí número 3, hoja de bisturí número 12, placa Petri cuadrado.



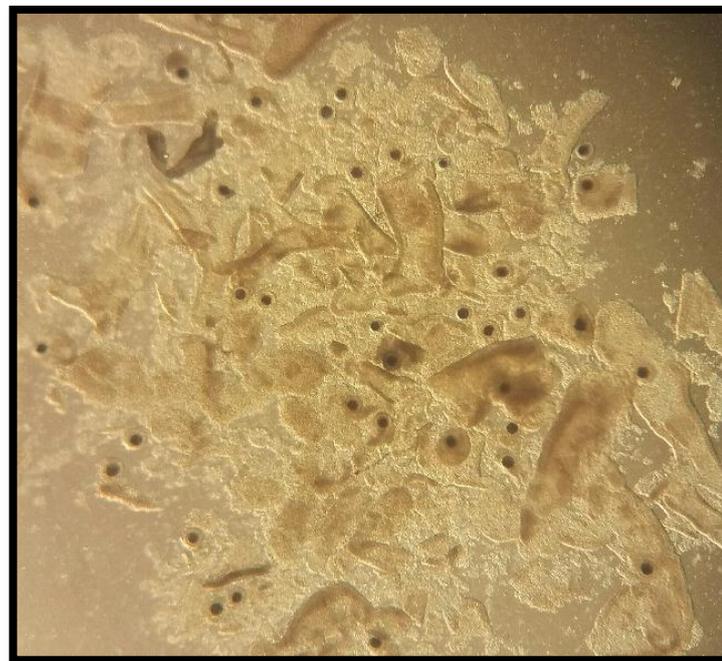
**FIGURA 4:** Ovario con folículos de 2 a 7 mm para ser colectados los ovocitos mediante la técnica slicing.

**A-2**

**MADURACIÓN, FERTILIZACIÓN Y  
CULTIVO EMBRIONARIO**



**FIGURA 5:** Recuperación de los ovocitos por el método slicing



**FIGURA 6:** Ovocitos de categoría I, II y III



**FIGURA 7:** Colección de semen con maniquí.



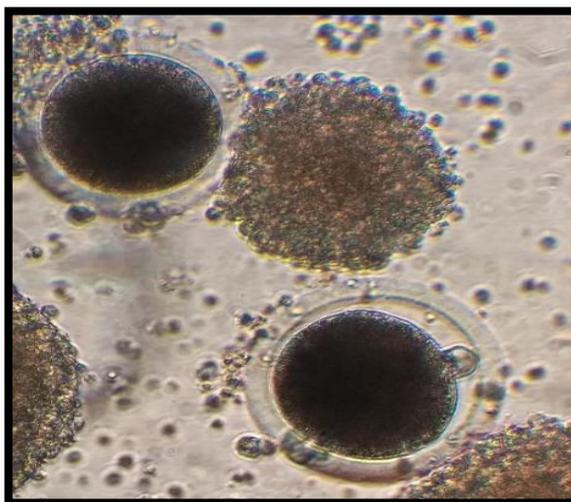
**FIGURA 8:** Separación de espermatozoides con el método Percoll 45% y 22.5% y la capacitación espermática.



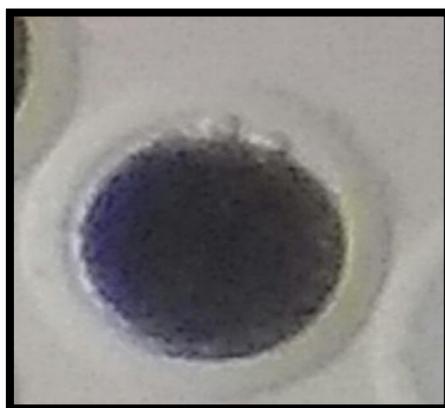
**FIGURA 9:** Fertilización por inseminación con espermatozoides capacitados.

**A-3**

**EVALUACIÓN MADURACIÓN,  
FERTILIZACIÓN Y EMBRIONES**



**FIGURA 10:** Ovocito madurado por 32 horas, en la imagen se observa con el primer corpúsculo polar y con presencia del espacio peri vitelino.



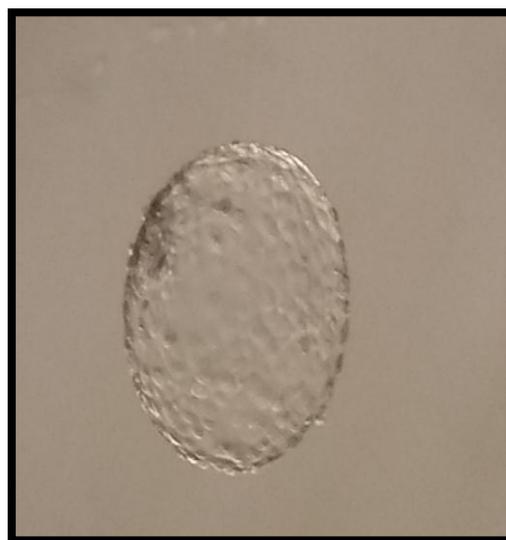
**FIGURA 11:** Aparición del segundo corpúsculo polar en ovocitos evaluados 10 horas post fertilización.



**FIGURA 12:** Cigotos en división celular.



**FIGURA 13:** Blastocistos expandidos con adición del factor embriotrófico EGF cultivados a una tensión de oxígeno de 6%



**FIGURA 14:** Blastocistos eclosionados con adición del factor embriotrófico IGF cultivados a una tensión de oxígeno.