

UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCABELICA

(CREADA POR LEY N° 25265)



FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE ZOOTECNIA

TESIS

**EVALUAR LA CAPACIDAD FECUNDANTE DE
ESPERMATOZOIDES REFRIGERADOS EN LA
PRODUCCION DE EMBRIONES IN VITRO EN
ALPACAS (*Vicugna pacos*) HUACAYA**

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
REPRODUCCIÓN ANIMAL

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO ZOOTECNISTA

PRESENTADO POR:

Bach. MARTINEZ CHAVEZ, Esther

Bach. RAMOS APONTE, Milca Isabel

ASESOR:

Dr. Jaime Antonio, RUIZ BEJAR

HUANCABELICA - PERÚ

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCAVELICA

FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En el Auditorium de la Facultad de Ciencias de Ingeniería, a los 18 días del mes de mayo del año 2015, a horas 4:00 p.m, se reunieron los miembros del Jurado Calificador conformado por los siguientes: Dr. Nicasio VALENCIA MAMANI (PRESIDENTE), Ing. Marino ARTICA FÉLIX (SECRETARIO), M.Sc. Rufino PAUCAR CHANCA (VOCAL), designados con Resolución de Consejo de Facultad N° 543-2013-FCI-UNH, de fecha 20 de diciembre del 2013, y ratificados con Resolución de Decano N° 031-2015-FCI-UNH de fecha 13 de mayo del 2015, a fin de proceder con la evaluación y calificación de la sustentación del informe final de tesis titulado: "EVALUAR LA CAPACIDAD FECUNDANTE DE ESPERMATOZOIDES REFRIGERADOS EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO EN ALPACAS (Vicugna pacos) HUACAYA", presentada por las Bachilleres Esther Martínez Chávez y Milca Isabel Ramos Aponte, para optar el Título Profesional de Ingeniero Zootecnista; en presencia del Dr. Jaime Antonio RUIZ BEJAR, Asesor, del presente trabajo de tesis. Finalizado la evaluación a horas 5:30 p.m se invitó al público presente y a las sustentantes abandonar el recinto. Luego de una amplia deliberación por parte de los Jurados, se llegó al siguiente resultado:

Esther MARTÍNEZ CHÁVEZ

APROBADO POR MAYORÍA

DESAPROBADO

Milca Isabel RAMOS APONTE

APROBADO POR MAYORÍA

DESAPROBADO

En señal de conformidad, firmamos a continuación:

[Signature]
Presidente

[Signature]
Secretario

[Signature]
Vocal

[Signature]
VP. Bº Decano (e)

A Dios, a mi madre Isabel, a la memoria de mi padre Francisco que desde el cielo me sigue guiando y hermanos por su apoyo y consejos en mi formación profesional.

Esther

A Dios, a mis padres Jesús e Irma y hermanos quienes son el motivo de mi superación y apoyo incondicional durante mi formación profesional.

Milca

AGRADECIMIENTO

- Agradecerte a ti Dios por amarnos y darnos todo en la vida, gracias por estar a nuestro lado a cada instante, por ser nuestra fortaleza y la luz que guía nuestro camino.
- A la Universidad Nacional de Huancavelica, nuestra alma mater, por brindarnos los más grandes conocimientos en nuestra formación profesional. A la Escuela Académico Profesional de Zootecnia y Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas, por permitimos la utilización de sus instalaciones, equipos y materiales durante la fase experimental de nuestra tesis.
- Al Dr. Jaime Antonio Ruiz Bejar, Asesor de la tesis, por su apoyo durante la ejecución del proyecto.
- A José Luis Mendoza Mallma, compañero de la E.A.P. de Zootecnia, por su apoyo, en la parte experimental del proyecto de tesis.
- A los catedráticos de la E.A.P. de Zootecnia, por sus enseñanzas en nuestra formación profesional.
- A la Ing. Leandra Landeo Jurado, por su apoyo y colaboración en el asesoramiento en la ejecución de la tesis.
- A nuestros compañeros de laboratorio: Lisbeth, Edgar, Sugar, Dilmer, Octavio, Alexei, por su apoyo, amistad, amabilidad y por el buen ambiente de trabajo durante el tiempo de estadía en el laboratorio.
- Al Ing. Ysai Paucar Sullca, por su apoyo y colaboración en el asesoramiento estadístico del proyecto de tesis.
- A nuestras familias, por su comprensión y ayuda en los momentos buenos y malos. Muy especialmente a nuestros padres, por brindarnos todo su apoyo, sus consejos, su esfuerzo y dedicación, de lo cual estamos infinitamente agradecidas.
- A nuestros amigos de toda la vida, por sus constantes palabras de aliento, que fueron la fuerza para seguir adelante y culminar con este trabajo.

Las Tesistas.

71

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTO	
	Pág.
ÍNDICE GENERAL	4
RESUMEN	98
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
CAPÍTULO I: Problema	11
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	12
1.3. OBJETIVO	12
1.3.1. GENERAL	12
1.3.2. ESPECÍFICOS:	12
1.4. JUSTIFICACIÓN	12
CAPÍTULO II: Marco Teórico	14
2.1. ANTECEDENTES	14
2.2. BASES TEÓRICAS	18
2.2.1. Ovogenesis	18
2.2.2. Fecundación In Vitro	23
2.2.3. Recuperación de espermatozoides del epididimo	24
2.2.4. Selección de espermatozoides	25
2.2.5. Dilutores	26
2.2.6. Semen refrigerado	28
2.2.7. Capacitación espermática	28
2.2.8. Evaluación de la motilidad espermática	29
2.2.9. Evaluación de la vitalidad	29
2.2.10. Fecundación con semen refrigerado	30
2.2.11. Desarrollo embrionario	31
2.3. HIPÓTESIS	32
2.4. VARIABLES DE ESTUDIO	32
2.4.1. Variable dependiente	32
2.4.2. Variable independiente	32

2.4.3. Definición operativa de variables	33
CAPÍTULO III: Metodología de la Investigación	34
3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO	34
3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN	34
3.3. NIVEL DE INVESTIGACIÓN	34
3.4. MÉTODO DE INVESTIGACIÓN	34
3.5. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	34
3.6. POBLACIÓN, MUESTRA, MUESTREO	35
3.7. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	35
3.7.1. Técnicas	35
3.7.2. Instrumentos	36
3.8. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS	36
3.8.1. Procedimiento para la producción de embriones in vitro	36
3.8.2. Evaluación del desarrollo embrionario	40
3.9. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS	41
CAPÍTULO IV: Resultados	42
4.2. DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIONES	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	57
BASE DE DATOS	65
FOTOGRAFÍAS	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°01. Clasificación del Complejo Cúmulo Ovocito (CCOs) de Alpaca	23
Tabla N°02. Operacionalización de variables e indicadores	34
Tabla N°03. Diseño experimental.....	35
Tabla N°04. Promedio \pm desviación estándar de la división (DIV), mórula (MOR) y blastocisto (BLAST) durante los tiempos de refrigeración	43
Tabla N°05. Evaluación de espermatozoides	45

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafico N° 01: Porcentaje de producción de embriones en los diferentes tiempos de refrigeración de espermatozoides de alpaca 44

RESUMEN

El objetivo del trabajo de investigación fue evaluar la capacidad fecundante de espermatozoides refrigerados para la producción de embriones *in vitro* en alpacas (*Vicugna pacos*) Huacaya. Se evaluaron muestras de espermatozoides refrigerados a 5°C por 0 horas, 4 horas y 8 horas, los espermatozoides se diluyeron en TRIS. Para 0 horas se obtuvo una vitalidad de 78%, motilidad 80% y una concentración de 105×10^6 espermios/ml; para 4 horas se obtuvo una vitalidad de 64%, motilidad 71% y una concentración de 82×10^6 espermios/ml; para 8 horas se obtuvo una vitalidad de 60%, motilidad 62% y una concentración de 75×10^6 espermios/ml. Los ovocitos se maduraron a 40 horas en medio de maduración TCM-199. En cuanto a los embriones se determinaron los porcentajes de división, mórula y blastocisto. El modelo estadístico para evaluar la producción de embriones incluyó el efecto del tiempo de refrigeración de espermatozoides de alpaca. Mediante la prueba de ANOVA la media y la desviación estándar para división fueron 0 horas; 48 ± 3.00 , 4 horas; 45.10 ± 9.09 y 8 horas; 45.57 ± 7.75 % para mórula: 0 horas; 67.69 ± 8.94 , 4 horas; 55.81 ± 12.20 y 8 horas; 52.99 ± 15.06 % y para blastocisto: 0 horas; 20.67 ± 4.24 , 4 horas; 19.62 ± 5.76 y 8 horas; 19.13 ± 7.68 %. A medida que el tiempo de refrigeración a 5°C de los espermatozoides de alpaca aumenta, el porcentaje de producción de embriones por fecundación *in vitro* disminuye.

Palabras clave: Alpaca, espermatozoides refrigerados, fecundación *in vitro*, división, mórula, blastocisto.

ABSTRACT

The aim of the research was to evaluate the fertilizing capacity of sperm refrigerated for in vitro embryo production in alpacas (*Vicugna pacos*) Huacaya. Sperm samples cooled at 5 ° C for 0 hours, 4 hours and 8 hours, sperm were diluted in TRIS were evaluated. For 0 hours vitality of 78%, 80 % motility and concentration of 105×10^6 sperm /ml was obtained; for 4 hours 64 % vitality, motility 71% and a concentration of 82×10^6 sperm / ml was obtained; for 8 hours 60 % vitality, motility 62% and a concentration of 75×10^6 sperm / ml was obtained. The oocytes were matured for 40 hours in maturation medium TCM-199. Embryos regarding division rates, morula and blastocyst were determined. The statistical model to assess embryo production included the effect of cooling time alpaca sperm. By ANOVA the mean and standard deviation for division were 0 hours; 48 ± 3.00 , 4 hours; 45.10 ± 9.09 , 8 hours; 45.57 ± 7.75 % for morula: 0 hours; 67.69 ± 8.94 , 4 hours; 55.81 ± 12.20 and 8 hours; 52.99 ± 15.06 % and blastocyst: 0 hours; 20.67 ± 4.24 , 4 hours; 19.62 ± 5.76 and 8 hours; 19.13 ± 7.68 %. As the cooling time to 5 ° C alpaca sperm increases, the production rate for IVF embryos decreases.

Key words: Alpaca, chilled sperm, IVF, division, morula, blastocyst.

INTRODUCCIÓN

El Perú tiene el privilegio de ocupar el primer lugar en el mundo en la tenencia de alpacas. El aprovechamiento racional de esta ventaja comparativa es el reto del Perú encarar como el medio más efectivo de lucha contra la pobreza y la inseguridad alimentaria que afecta a las comunidades campesinas que viven de la crianza de esta especie (Quispe *et al.*, 2013).

La Alpaca (*Vicugna pacos*); Linnaeus (1758) y Gentry *et al.*, (2004), es una de las especies de camélidos sudamericanos más importantes, debido al valor económico que representa la producción de la fibra para las comunidades alto andinas. Es así que, urge aplicar programas de mejoramiento genético para incrementar la calidad y cantidad de fibra. La aplicación de biotecnologías reproductivas podría contribuir rápidamente al mejoramiento genético logrando la multiplicación de animales de alto valor productivo, formando núcleos genéticos que puedan proveer reproductores para los criadores de estos animales, y darles más sustento económico (Ruiz, 2009).

Una de estas tecnologías que hoy en día se están aplicando en Camélidos Sudamericanos, es la fecundación *in vitro* (FIV); sin embargo, esta se encuentra en estado formativo, requiriendo de mayor investigación para su total desarrollo. Esto motivó a realizar la presente investigación sobre la capacidad fecundante de espermatozoides refrigerados en la producción de embriones *in vitro* en alpacas (*Vicugna pacos*).

El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar el tiempo óptimo (04 ó 08 horas) de refrigeración de espermatozoides de alpaca para la producción de embriones *in vitro* con espermatozoides refrigerados de alpaca. Para su respectiva evaluación sobre la tasa de división, mórula y blastocisto. Luego de la fecundación *in vitro*. Datos que aún son desconocidos para la ciencia e importantes para el avance de la biotecnología reproductiva en Camélidos Sudamericanos.

Las Tesistas

CAPITULO I

PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Perú es el primer productor mundial de alpacas, con una población de 3 592 249 cabezas. De los cuales la región de Huancavelica cuenta con 308 586 cabezas de alpaca a nivel nacional (INEI, 2012).

La crianza de alpacas es una actividad de vital importancia para un amplio sector de la población altoandina. Se estima que alrededor de 74 922 familias de la región Huancavelica dependen directamente de la actividad de camélidos sudamericanos (INEI, 2012).

La inseminación artificial con semen congelado ha sido una potente herramienta para el mejoramiento genético en vacunos y ovinos (Ruiz et al., 2009).

En alpacas se han reportado tasas inferiores de motilidad post congelamiento tales como las mencionadas por Vaughan et al., (2003) que obtuvieron porcentajes de 17.4%; Santiani et al., (2005), reportaron la obtención de motilidades desde 4 a 20%.

Los porcentajes de preñez del 0 al 10 % obtenidos hasta el momento al inseminar con semen refrigerado o congelado de llama y alpaca (Bravo et al., 2000; Aller et al., 2003; Vaughan et al., 2003), indicarían que los espermatozoides de estas especies sufren un deterioro en su capacidad fecundante, porque a pesar de que se insemine con igual cantidad de espermatozoides viables y móviles, con el semen criopreservado se obtiene un menor porcentaje de preñez que con semen fresco.

En los pequeños rebaños no cuentan con animales de alto valor genético, se ha probado con el traslado de machos hasta sus rebaños, donde estos no responden con monta natural y no se aparean, en algunos casos nunca, ya que no están acostumbrados a la zona, además en campaña de empadre nadie presta machos por el periodo de dos meses ya que es el tiempo aproximado para adaptarse a la zona. La alternativa sería coleccionar semen en donde están acostumbrados estos machos, donde se refrigeraría, y de ahí el semen refrigerado se trasladaría a los rebaños para realizar la inseminación artificial, por tal motivo nosotras hacemos este trabajo de investigación para ver la fertilidad de los espermatozoides refrigerados *in vitro* y después esto se podría aplicar en campo.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Existe capacidad fecundante de espermatozoides refrigerados en la producción de embriones *in vitro* en alpacas (*Vicugna pacos*) Huacaya?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad fecundante de espermatozoides refrigerados para la producción de embriones *in vitro* en alpacas (*Vicugna pacos*) Huacaya.

1.3.2. OBJETIVO ESPECIFICO

- Determinar el tiempo óptimo de refrigeración (04 ó 08 horas) para la producción de embriones *in vitro* con espermatozoides refrigerados de alpaca.
- Evaluar la calidad de espermatozoides refrigerados a 04 y 08 horas a post refrigeración.
- Determinar el porcentaje de división, mórula y blastocisto.

1.4. JUSTIFICACIÓN

La Alpaca (*Vicugna pacos*); Linnaeus (1758) y Gentry et al., (2004), es una de las especies de camélidos sudamericanos más importantes, debido al valor económico que representa la producción de la fibra para las comunidades alto andinas. Es así que urge aplicar programas de mejoramiento genético para incrementar la calidad y cantidad de fibra y así atender a un mercado nacional e internacional cada vez más exigente.

Al establecer la técnica adecuada en la producción de embriones por fecundación in vitro (FIV) con espermatozoides refrigerados, permitirá al productor tener una alternativa en la mejora de su rebaño acortando tiempo y dinero, como bien se sabe que la fibra de alpaca es uno de las más apreciadas en el mundo, alcanzando una alta cotización en el mercado internacional siendo calificado como fibra especial con las cuales se puede elaborar prendas de vestir de lujo. De esta manera lograr una mejor calidad de vida.

La refrigeración de semen de alpaca (*Vicugna pacos*), nos permite la conservación para su utilización en programas de inseminación artificial, transferencia de embriones y producción de embriones in vitro. Si bien en los últimos años han progresado las técnicas de conservación de espermatozoides en forma refrigerada, esta técnica nos permitirá mantener la viabilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides por períodos prolongados de tiempo hasta ser transportado de un rebaño a otro, y así convertirse en una potente herramienta para el mejoramiento genético. En este trabajo de investigación se logró obtener espermatozoides viables post refrigeración, sin duda es un gran aporte. Debido a que el presente trabajo encaja dentro de la política de investigación nacional, regional, local de instituciones involucradas con prioridad en el desarrollo del sector pecuario. Por tal motivo se realizará ensayos en la producción de embriones por fecundación in vitro (FIV) utilizando espermatozoides de alpaca post refrigeración y con ovocitos madurados a 40 horas, para lo cual se trabajó con testículos y ovarios en el camal.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

Gamarra et al., 2008, realizó fecundación *in vitro* en alpacas, congelo espermatozoides epididimarios diluidos en solución TRIS fructosa con 10% de glicerol. La dosis de inseminación fue 10×10^6 de espermatozoides/gota, donde obtuvieron 27.1% de segmentación, 8% de mórula y 3% de blastocisto eclosionado.

Conde et al., 2008, realizaron trabajos con semen fresco de llamas, en la producción de embriones de llamas *in vitro* obteniendo 17%, (16/94) de blastocistos expandidos y recientemente producido un 15% (5/33) blastocistos expandidos después del cultivo en DMEM-F12.

Huanca y Gaulty (2001), para la conservación del semen refrigerado en llamas, se evaluó la acción de BSA + glucosa, desde una motilidad inicial de 57.6 %, descendió a 43.0 % a las 24 horas, hasta este porcentaje es aceptable para realizar la inseminación artificial, por lo que se recomienda su uso, a partir de las 24 horas la motilidad va descendiendo progresivamente.

Chahuayo y Paytan (2013), evaluar la influencia de los dilutores TRIS (T1), SP-TALP (T2) y ANDROMED (T3) sobre la viabilidad de los espermatozoides epididimarios refrigerados de alpacas a 00, 04, 08, 12, 24 y 48 horas. Llegando a resultados, donde los tres tratamientos son buenos, conservando el 68% de la viabilidad con 64% de motilidad en promedio hasta los 4 horas; pero el T3 es superior que T1 manteniendo el 79% de viabilidad con 71% de motilidad hasta 4 horas; respectivamente a los 8 horas, el T1 es superior que el resto conservando el 68% de viabilidad con 66% de

motilidad de los espermatozoides, con una concentración en promedio de 77×10^6 espermatozoides/ml.

Rivera (1998), indica que el tiempo de sobrevivencia de espermatozoides colectados por vagina artificial es importante por lo cual se evaluó la acción de la yema de huevo en la conservación y la glicerina en la congelación, usados en diferentes concentraciones, encontrándose que la mejor proporción de yema de huevos es de 20 % ya que la glicerina a diferentes concentraciones no representa diferencia significativa. A las 18 horas se tuvo una sobrevivencia de 21.78 %, con un porcentaje inicial de 56.66%. Sin embargo, ningún componente lipídico ha sido capaz de imitar y sustituir la yema de huevo en los procedimientos de congelación, lo que puede sugerir que la sinergia de varios componentes que figuran en la yema de huevo como son los antioxidantes, y micro elementos, pueden ser claves en el proceso (Maldjiana et al., 2005).

Pérez et al., (2006), realizaron el trabajo de congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de camélidos en buffer TRIS con diferentes proporciones de yema de huevo y glicerol con el objetivo de determinar la sobrevivencia de los espermatozoides de alpacas y llamas exentos de secreción de las glándulas anexas a la congelación. Los espermatozoides fueron colectados por desviación de los conductos deferentes, evaluados, envasados en pajillas de 0.25 ml, se procedió a congelar en vapores de nitrógeno líquido, la descongelación se realizó en baño María a 37 °C por 30 segundos. La motilidad progresiva a la post-descongelación se evaluó adecuando la salida del microscopio a la pantalla de un televisor, los resultados obtenidos fueron: el volumen de 0.263 y 0.418 ml para alpacas y llamas. La concentración fue 25.53 y 40.49 millones de espermatozoides/ml para alpacas y llamas. La morfología de los espermatozoides normales fue: 61.72 % para alpacas y 59.16 para llamas sin diferencia, anormalidades primarias 7.03 % y 15.99% con diferencia y anormalidades secundarias 31.25% y 24.85% similares, en alpacas y llamas respectivamente. La motilidad progresiva inicial (dilución) fue 74.3%, 77.7% y 68.6% en alpacas y 63.0%, 66.9% y 59.1% en llamas con diferencia, a la descongelación varió el índice de recuperación del 18.0% al 43.0% dependiendo del

nivel de yema de huevo. En conclusión, los espermatozoides exentos de la secreción de la próstata y glándulas bulbo uretrales soportan la congelación.

En alpacas se han realizado escasos estudios de refrigeración de semen obtenido por vagina artificial, posiblemente debido a una irregular producción espermática del macho, relacionado a su tamaño testicular o por las dificultades en el desarrollo de protocolos de colección, dilución y conservación del semen (Sumar J. 1997), con resultados pocos satisfactorios en los protocolos de congelación de semen (Vaughan J., 2004), han limitado la técnica con el uso de semen fresco. En sí, a la fecha no se cuenta con un protocolo de manejo de semen refrigerado de bajo costo y de fácil provisión, lo cual limita el desarrollo de un programa de mejoramiento genético.

Huamán et al., (2011) maduraron ovocitos de alpaca obtenidos por aspiración folicular de ovarios de alpacas sacrificadas, en medio TCM-199 durante 25 horas para luego ser fecundados con 10ul de espermatozoides epididimario recuperados por el método de Swin-up. Cultivados en atmosfera (5% de CO₂) y atmosfera con mezcla de gases (90% N₂, 5% CO₂ y 5% O₂), obteniendo como resultados de división, mórula y blastocistos para los embriones cultivados en atmosfera de cultivo con 5% de CO₂ fueron: 86,36%; 78,26% y 10,04%, respectivamente, sin embargo los embriones cultivados en atmosfera de cultivo con mezcla de gases (90% N₂, 5% CO₂ y 5% O₂) mostraron los siguientes resultados: 91,28%; 86,11% y 11,22% de división, mórula y blastocisto, respectivamente.

En otro estudio Huanca et al., (2009), utilizando un medio de maduración TCM-199 suplementado con 10% FCS (v: v) más 0.5 µg mL⁻¹ FSH, 10 µg mL⁻¹ hCG, 0.2 mM piruvato de sodio, 50 µg mL⁻¹ gentamicina y 1 µg mL⁻¹ Estradiol, encontraron 18,9 ± 15,7, 42,9 ± 16,2 y 65,8 ± 8,1% de ovocitos maduros de alpaca que llegaron a Metafase II cuando utilizaron 30, 34 y 38 horas de la cultivo, respectivamente.

Santayana (2012), maduró ovocitos de alpaca en medio TCM-199 por espacio de 24, 28 y 32 horas, fijados en una solución de metanol: ácido acético (3:1) y teñidos con orseina acética al 1% para evaluar el estadio de maduración nuclear (vesícula germinal-VG, vesícula germinal rota-GVBD, metafase I-MI, metafase II-MII). Obteniendo mejor porcentaje de maduración nuclear (ovocitos en estadio de metafase II- MII) a las 32 horas de cultivo *in vitro* con un 65.08%, de los resultados de los

porcentajes de segmentación y blastocisto, aumentaron gradualmente hacia el mayor tiempo de maduración, siendo el de 32 h el tiempo con el mayor índice de desarrollo alcanzado, con un 60.17% y 17.02% para los estadios de segmentación y blastocisto respectivamente. Concluye que el tiempo óptimo para la maduración nuclear y la adquisición máxima de la capacidad de desarrollo embrionario *in vitro*, de ovocitos de alpaca, fue de 32 h.

Ayuque et al., (2013) determinaron el tiempo óptimo de maduración nuclear de ovocitos de llama (*Lama glama*) en el desarrollo de embriones producidos por fecundación *in vitro*, para el recuperaron 1100 ovocitos de 178 ovarios (89 llamas) de animales que fueron beneficiados en el camal municipal de Huancavelica; utilizaron 672 ovocitos de categoría I y II obtenidos por aspiración folicular de ovarios de llamas, fueron madurados en medio TCM-199 suplementado con HEPES 25 mM, piruvato de sodio 0.2 mM, sulfato de gentamicina 50 µg/ml, FSH 0.02 unidades/ml, Estradiol 17-β 1 µg/ml y suero fetal bovino al 10%, e incubados a 38.5°C en una atmósfera de aire estéril con 5% CO₂ y 90% de humedad por espacio de 28, 36 y 42 horas. Transcurrido estos tiempos, los ovocitos fueron retirados del medio y sumergidos en una solución de hialuronidasa al 0.1% para ser separados de las células del cúmulo. Los ovocitos fueron fijados en una solución de metanol: ácido acético (3:1) y teñidos con orseina acética al 1% para evaluar el estadio de maduración nuclear (vesícula germinal-VG, vesícula germinal rota-GVBD, metafase I-MI, metafase II-MII). Luego, realizaron la fecundación *in vitro* y evaluaron el desarrollo embrionario, para lo cual procedieron a madurar los ovocitos del mismo modo que en el ensayo anterior, conservando los tiempos de 28, 36 y 42 horas. Recuperaron espermatozoides epididimarios en medio Sp-TALP seleccionandolos mediante la técnica de Swin-up, teniendo una concentración promedio de 1.5-2x10⁶ espermatozoides/ml para inseminar los ovocitos. Transcurridas las 18 h de fecundación, los presuntos cigotos fueron transferidos al medio SOF-IVC e incubados por 7 días a 38.5°C, en una atmósfera de aire estéril con 5% CO₂ y 90% de humedad. Los resultados obtenidos muestran que el mayor porcentaje de maduración nuclear (ovocitos en estadio de metafase II- MII) de cultivo *in vitro*, está entre 36 y 42 horas (70.17±4.21% y 70.53±3.72%) respectivamente, seguida de 28 horas (49.14±2.79%) con diferencias estadísticas significativas (p

<0.05). Por otra parte, en cuanto a los resultados del desarrollo embrionario, obtuvieron porcentajes de segmentación, mórula y blastocisto ($51.00\pm 3.31\%$, $71.47\pm 2.49\%$ y $11.64\pm 1.30\%$) respectivamente para 36 horas y el porcentaje de segmentación, mórula y blastocisto ($49.55\pm 3.56\%$, $76.69\pm 2.90\%$ y $12.51\pm 2.22\%$) respectivamente para 42 horas. Concluyendo que el tiempo óptimo que requiere los ovocitos de llama para llegar a la madurez nuclear (metafase II) está entre 36 y 42 horas, encontrando la misma capacidad de desarrollo embrionario *in vitro* en este mismo periodo de tiempo.

2.2. BASES TEORICAS

2.2.1. OVOGENESIS

A. Ovocito

El ovocito es una célula única y grande rodeada por la zona pelúcida (ZP) y por distintas capas de células de la granulosa formando el complejo cúmulus ovocito (COC). Las células de la granulosa inmediatamente adyacentes al ovocito, la corona radiata, tienen largas extensiones citoplasmáticas las que penetran la ZP y terminan en dilataciones bulbosas estrechamente asociadas con la membrana del ovocito (Massip, 2003).

La presencia de estos procesos y de las uniones gap juegan un rol importante en la cooperación metabólica entre el ovocito y las células del cúmulo durante la fase de crecimiento del mismo (Van Soom et al., 2002).

B. Crecimiento del ovocito

El desarrollo de los folículos hasta el estadio primario es lento, lleva años, pero una vez que se reinicia el crecimiento se lleva a cabo en tres semanas aproximadamente. Shamsuddin et al., (1993), mencionan que en comparación con las células somáticas, las cuales normalmente miden $10\ \mu\text{m}$, este proceso además de largo, es extremoso en lo que respecta al incremento de tamaño del ovocito. En la mujer del tamaño original de $10\ \mu\text{m}$ llega a un tamaño final de $80\ \mu\text{m}$, en la ratona de 20 a $70\ \mu\text{m}$, etc.

Francois et al., (1997) mencionan que periódicamente cierto número de folículos primordiales inician su crecimiento. Cada ovocito está dentro de un folículo con una sola capa de células epiteliales o granulosa, y una del mesénquima o células tecales, conforme aumenta el número de capas de

células de la granulosa, el ovocito secreta una sustancia mucoide rica en glicoproteínas, la cual forma una banda (que se convierte en la zona pelúcida) entre el núcleo y las capas celulares. Finalmente, cuando el crecimiento cesa, el ovocito incrementa hasta 500 veces su tamaño, y está rodeado de varias capas de células granulosas y células tecaes además, de un núcleo grande o vesícula germinativa (VG).

Posteriormente, se van formando algunos espacios celulares llamados antros foliculares, los cuales se van llenando con un líquido rico en hormonas esteroides, peptídicas (incluyendo la oxitocina y relaxina), prostaglandinas y varios factores de crecimiento locales, cuyas concentraciones son mayores que las sanguíneas, y para las cuales existen moléculas receptoras en toda la pared del oviducto (Choi et al., 1998). Conforme aumenta el antro, las células de la granulosa siguen proliferando y forman un hilillo que atrae al ovocito hacia el centro y lo rodean formando el complejo cúmulos ovocito (COC) permaneciendo así hasta la ovulación (Scott 1994, Shamsuddin et al., 1993 y Griffin y Ojeda, 1992).

Este período de encierro, se cree que es mantenido por un factor inhibidor producido por las células foliculares.

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

C. Maduración del ovocito

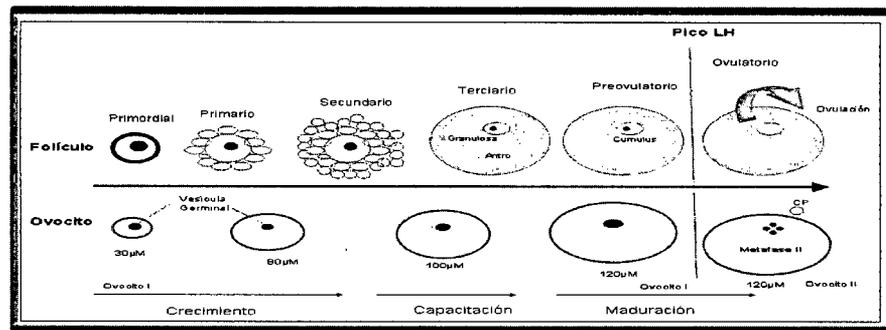
Antes de la ovulación la vesícula germinal se rompe activado por el pico de LH y continúa la meiosis hasta la metafase II, transformándose el ovocito primario ($2n$) del folículo de Graaf en ovocito secundario (n) con formación del primer cuerpo polar. La meiosis no se completa hasta luego de la fertilización. (Shamsuddin et al., 1993), (Dale y Elder, 1997).

Durante la maduración del ovocito, se producen una compleja serie de modificaciones en el citoplasma, junto con la maduración meiótica del núcleo

SS

y ciertos cambios en la membrana, con el fin de preparar a este ovocito para ser fecundado con éxito y poder mantener la primera fase de desarrollo embrionario. (Shamsuddin et al., 1993), (Dale y Elder, 1997).

Figura 1. Fases del crecimiento, capacitación y maduración durante la foliculogénesis del ovocito.



Fuente: Mermillod et al., (1999).

C.1. Maduración de la zona pelúcida (ZP)

La ZP es una glicoproteína secretada por el ovocito durante su crecimiento, y está compuesta por 70% de proteínas, cuyas mejor conocidas son ZP1, ZP2 y ZP3, 20% de hexosa, 3% de ácido siálico y 2% de sulfato (Dale y Elder, 1997). La integridad de esta zona durante la maduración es importante porque facilita la disponibilidad de nutrientes para este proceso Brackett (1985), aportando principalmente piruvato y oxalacetato. El rompimiento prematuro de esta capa resulta en la muerte del ovocito.

D. Recuperación de ovocitos para maduración *in vitro* (MIV)

Normalmente, los ovocitos que se utilizan en los procesos de MIV y fertilización *in vitro* (FIV), son obtenidos de los ovarios de los animales que son sacrificados para consumo, lo cual viene a ser una fuente económica que permite la recuperación de gran número de ellos (Bols et al., 1996; Pieterse et al., 1988).

Otra forma de obtención de ovocitos es de animales vivos, a través de la punción folicular: ovum pick up (OPU), técnica que fue originalmente creada para ser usada en humanos y que luego se modificó para ser usada en vacas (Pieterse et al., 1998), los ovocitos se pueden obtener también a través de

una laparotomía y aspiración directa desde los ovarios del animal anestesiado, técnica utilizada en primates inferiores.

Cuando los ovarios son obtenidos post faenamiento de las hembras, son transportadas desde el matadero, en solución fisiológica o solución fosfato buffer salino (PBS) con o sin la adición de antibióticos (Palma, 2001).

Distintas metodologías se han evaluado para la recuperación de COCs en hembras de camélidos sudamericanos (Ruiz J. y Correa J. 2007). Ovarios de alpacas y llamas beneficiadas son una fuente adecuada para la recuperación de COCs, por la gran disponibilidad de ovocitos para la investigación en la estandarización de protocolos de maduración y fecundación *in vitro*, y para su utilización como receptores de núcleo de células donadoras en un programa de transferencia nuclear.

Asimismo, se ha investigado la recuperación de COCs de hembras vivas en camélidos sudamericanos con buenos resultados, mediante procedimientos menos invasivos y que no requieren de una cirugía, utilizando la aspiración folicular transvaginal y la laparoscopia (Ruiz J. y Correa J. 2007).

E. Selección de ovocitos para maduración *in vitro*

Luego de la aspiración folicular, los Complejos Ovocito-Cúmulo (COCs) se clasificaron de acuerdo a la compactación del cúmulo y su aspecto citoplasmático, según los criterios de Ratto et al., (2005).

Tabla N° 01. Clasificación del Complejo Cúmulo Ovocito (COCs) de Alpaca

Categorías	Características por Categoría
1	COCs con cúmulos de capas múltiples (>5 capas), compacto, claro y transparente; citoplasma con granulación fina y homogéneo.
2	COCs parcialmente rodeados por células del cúmulo (entre 2-4 capas) más oscuros y menos transparentes; citoplasma de granulación más gruesa y más oscura que en la categoría 1.
3	COCs con cúmulo \leq 1 capa de granulosa o en partes desnudo.
4	Incluye a los ovocitos con cúmulo expandido, parcialmente desnudos o totalmente desnudos; citoplasma granular.

Fuente: Ratto et al., (2005).

F. Maduración *in vitro* de ovocitos

La maduración *in vitro* simula el tiempo transcurrido y sobre todo los procesos metabólicos que en forma natural ocurren en el ovocito contenido en el folículo dominante, entre el pico preovulatorio de LH hasta que se produce la ovulación (Ruiz et al, 2007). En la maduración de los ovocitos se reactiva la división meiótica desde el diploteno de la profase I de la primera división hasta alcanzar la metafase II de la segunda división meiótica, momento en que el ovocito ovula de forma natural y se mantiene en este estado hasta que sea fecundado por un espermatozoide o activado artificialmente para producir embriones partenogenéticos, por Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), por clonación o por transgénesis.

Muy pocos estudios han sido conducidos sobre la maduración *in vitro* de ovocitos (Del Campo et al., 1994; Sansinema et al., 2003; Chaves et al., 2003; Miragaya et al., 2002; Ratto et al., 1999, 2005; Ruiz y Correa, 2007),

en camélidos sudamericanos, sin embargo existe gran interés de diversos grupos investigadores en diferentes partes del mundo de investigar el desarrollo *in vitro* de embriones siendo una de las principales limitantes el desconocimiento del tiempo de maduración y fertilización de ovocitos. Una vez que los ovocitos hayan madurado estas se pueden utilizar en la producción de embriones por ICSI, FIV, Clonación y Transgénesis (Ruiz et al, 2007).

Para la maduración *in vitro* de ovocitos, se utilizan medios de cultivo clasificados en medios simples y complejos (Gordon, 1994). Un medio simple es aquel que contiene una solución salina fisiológica bufferada usualmente con bicarbonato y adicionada de piruvato, lactato y glucosa. Un medio de maduración complejo contiene además de los constituyentes de un medio simple, aminoácidos, vitaminas, purinas y otras sustancias encontradas asociadas al suero.

En Camélidos Sudamericanos el medio de cultivo usado con éxito es el Tissue Culture Medium-199 (TCM-199), con el ion híbrido (2-[4-(2-hidroxietil) piperazin-1-il] ácido etanosulfónico: HEPES) y bicarbonato, como estabilizadores de pH, y suplemento con piruvato lactato, vitaminas, aminoácidos, proteína y suero fetal bovino (Palma, 2001).

2.2.2. FECUNDACIÓN *in vitro* (FIV)

La FIV en el área pecuaria, se aplica para la obtención de embriones a gran escala y aprovechar el potencial genético de los animales sobresalientes con características de importancia económica (Brackett, 1988). Esta técnica, comienza con la obtención de ovocitos ya sea de los ovarios de animales sacrificados o animales vivos. Cuando este es el caso, los animales se someten a un tratamiento superovulatorio previo. Mediante aspiración se recolectan los ovocitos de los folículos antrales de 2-6 mm de diámetro. Estos folículos se caracterizan por contener altos niveles de testosterona y bajos niveles de progesterona y estradiol en el fluido (Cupps, 1987). Se seleccionan los ovocitos aptos para la maduración y se transfieren a un medio de cultivo enriquecido con suero y hormonas por 24-25 h (Bearden y Fuquay, 1997; Brackett, 1985 y Brackett, 1988).

La fecundación *in vitro* es el procedimiento por medio del cual los ovocitos maduros son cultivados junto con espermatozoides y de esta forma fecundados, para esto los espermatozoides deben ser sometidos previamente a un proceso de preparación *in vitro* con el objetivo de iniciar su capacitación y desencadenar la reacción acrosómica (Palma 2001).

La utilización de la fecundación *in vitro* en camélidos sudamericanos podría ser una alternativa para el mejoramiento genético de camélidos domésticos y para la preservación de los camélidos silvestres (Ruiz et al., 2007). Sin embargo existen pocos reportes de FIV en camélidos sudamericanos: Del Campo et al., (1994), Del Campo et al., (1995), Gómez et al., (2002), Conde et al., (2006), Ratto et al., (2007), Conde et al., (2008) y Gamarra et al., (2008) y hasta la fecha no ha nacido cría alguna de camélidos sudamericanos con la aplicación de esta técnica.

Por otro lado, el semen fresco o congelado, se lava y centrifuga para eliminar el plasma seminal y se incuba en un medio definido para iniciar la capacitación. Luego se ponen los espermatozoides con los ovocitos maduros a una concentración de 7×10^6 por cada ovocito. La fertilización ocurre en las próximas 18 horas. Durante los siguientes 2 a 3 días los ovocitos fertilizados alcanzan el estadio de 4 a 8 células. Entonces se cambia de medio y adiciona un co-cultivo para apoyar el desarrollo embrionario y se incuban por 6-7 días. En este tiempo se hace la evaluación, y la transferencia o congelación de los embriones obtenidos (Bearden y Fuquay, 1997; Griffin y Ojeda, 1992). El uso de los reproductores con la FIV se incrementa de un 60 a 100%, respecto al aprovechamiento con la monta directa.

2.2.3. RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS DEL EPIDÍDIMO.

Este método de colección, de manera análoga a la desviación de los conductos deferentes, tiene como objetivo la colecta de espermatozoides directamente de su reservorio, el epidídimo; sin embargo, es más radical al incluir en su protocolo la extirpación del testículo. La técnica consiste en la separación quirúrgica de las mencionadas gónadas y la escisión de las colas epididimarias respectivas a las que se les extrae los espermatozoides que llevan en su interior usando como medio una solución fisiológica buferada (PBS), obteniendo finalmente una suspensión de espermatozoides que se toma como muestra. Esta técnica está orientada

principalmente al rescate del germoplasma de individuos muertos súbitamente, cuyas especies se encuentren en peligro de extinción y cuyas colectas de semen sean difíciles de realizar (Anel et al., 2002); no obstante, la recuperación de espermatozoides epididimarios también se constituye en una herramienta factible de usarla con machos sin valor genético y/o económico como modelos para experimentar diversos efectos en las respuestas biológicas y fisiológicas de los espermatozoides. En camélidos sudamericanos se vienen recuperando espermatozoides epididimarios de llama y alpaca debido a la dificultad para obtener muestras de espermatozoides bajo los diferentes procedimientos descritos anteriormente Ratto et al., (1999). Santiani. A. (2012).

2.2.4. SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES

Al menos dos metodologías han sido descritas para el lavado de las células espermáticas y su selección en Camélidos Sudamericanos. Estas son: Swin-up (Mendoza et al., 2008, Huamán et al., 2011, Ayuque et al., 2013) y gradiente de percoll (Del Campo et al., 1994; Del Campo et al., 1995; Gómez et al., 2002; Conde et al., 2006; Ratto et al., 2007; Conde et al., 2008; Gamarra et al., 2008; Mendoza et al., 2008; Machicado et al., 2009; Berland et al., 2010). El método de swim-up separa los espermatozoides móviles de los no móviles. De este modo, una muestra de semen colocada en el fondo de un tubo que contiene medio de cultivo a 37°C, permitirá después de un tiempo de cultivo, que los espermatozoides móviles se desplacen hacia la superficie del tubo (Parrish et al., 1986).

El percoll está constituido por partículas coloidales de 15 a 30 nm de diámetro cubiertas con polivinilpirrolidona (PVP). El sistema de separación de espermatozoides consiste en la colocación, en un tubo estéril, de 2 gradientes de percoll (55% y 90%) diluido en medio de cultivo Sperm-TALP. El semen se siembra en la parte superior del tubo y se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Algunas partidas de percoll utilizado, tienen efectos deletéreos sobre los espermatozoides. Este efecto es debido principalmente al PVP que rodea a las partículas coloidales.

Un estudio realizado por Mendoza et al., 2008 comparó estas dos técnicas, gradiente de Percoll y Swim-up, para utilizarlos en la fecundación *in vitro* de ovocitos

de alpaca. Los resultados mostraron que, si bien los medios utilizados en las dos técnicas difieren entre sí, la separación por Swim-up fue más efectiva que la de gradiente de percoll.

Una vez que los espermatozoides han sido lavados, seleccionados y capacitados, se realiza el co-cultivo de estos con los ovocitos madurados *in vitro*.

A. Relación ovocito /espermatozoide en el co-cultivo

La relación ovocitos /espermatozoides es importante durante la fertilización *in vitro*. De este modo, ha podido establecerse que si el número de células espermáticas es demasiado bajo en relación con el número de ovocitos, obtendremos resultados de fertilización pobres. Si por el contrario, el número de células espermáticas es demasiado alto se producen fenómenos de polispermia (First y Parrish, 1987; Saeki et al., 1990).

Independientemente del medio de fertilización utilizado, la mayor parte de los protocolos de fertilización *in vitro*, utilizan entre 0.5 y 3.5×10^6 células espermáticas/ml y el co-cultivo con los ovocitos madurados *in vitro*, se lleva a cabo en microgotas de 50 μ l, que contienen entre 5 y 10 ovocitos (Del Campo et al., 1994; Del Campo et al., 1995; Gómez et al., 2002; Conde et al., 2006; Ratto et al., 2007; Conde et al., 2008; Gamarra et al., 2008; Mendoza et al., 2008; Machicado et al., 2009; Berland et al., 2010).

Cox et al., (1993) y Zhang et al., (1995) informan que la presencia de las células de los cúmulos en los ovocitos co-cultivados con los espermatozoides, incrementan los porcentajes de fertilización. Estos incrementos son debidos a que el cúmulo induce los mecanismos de capacitación espermática, facilitando la interacción del espermatozoide y la superficie de la zona pelúcida.

2.2.5. DILUTORES

Los dilutores de espermatozoides contienen componentes protectores que permiten la sobrevivencia fuera de tracto reproductivo. Además de esto aumentan el volumen de la dosis inseminante. Yema de huevo, leche y glicerol son los componentes más adicionados para la protección de los espermatozoides frente al descenso de temperatura. Las lipoproteínas presentes en la leche y la yema de huevo protegen a los espermatozoides del choque térmico. Substratos metabolizables como

glucosa constituyen la fuente de energía para las células espermáticas. Los diluyentes deben contener sustancias con alta capacidad tampón para neutralizarlos. Los antibióticos son adicionados en forma rutinaria a los diluyentes para retardar o eliminar el crecimiento de bacterias que invariablemente contaminan el semen como consecuencia de la recolección, los antibióticos más empleados son la penicilina G-potásica o sódica cristalina, la gentamicina o amikacina, la estreptomycin. La combinación de penicilina G-potásica cristalina con amikacina fue más eficaz en el control de bacterias anaerobias. La presión osmótica y el pH del diluyente deben ajustarse para favorecer la sobrevivencia espermática. El pH de los diluyentes puede variar entre 6,7 y 7,2 sin afectar la calidad espermática durante el almacenamiento (Pineda y Pinilla, 2007).

(Vaughan et al., 2003), los dilutores que mantuvieron mayor número de espermatozoides vivos, como: tris tamponado 70%; tryladil 65%; yema de huevo, glucosa y citrato 8%.

La yema de huevo se ha identificado con efectos positivos en la refrigeración y la congelación de los gametos masculinos. Es posible que permita intercambios de componentes lipídicos con los espermatozoides durante la criopreservación (Maldjiana et al., 2005).

(Westerdorf et al., 1975), Desarrollaron dos métodos de congelación que pueden ser aplicados a nivel comercial y que en esencia son los que se continúan utilizando hoy en día. Ambos métodos utilizan diluyentes que están basados en la utilización de la yema de huevo y glicerol como agentes crioprotectores, una concentración elevada de azúcares y la adición de un agente detergente. El método alemán utiliza un medio que consta de lactosa (11%) y yema de huevo (20%) y envasa las muestras seminales en pajuelas de 5 ml.

Con respecto a los diluyentes, un punto clave durante el proceso de enfriamiento y congelación son sus lípidos. Los lípidos desempeñan un papel clave durante la criopreservación de semen porcino. Algunas fracciones lipídicas han sido identificadas de gran importancia en la protección de los espermatozoides. Sin embargo, ningún componente lipídico ha sido capaz de imitar y sustituir la yema de huevo en los procedimientos de congelación, lo que puede sugerir que la sinergia de

varios componentes que figuran en la yema de huevo como son los antioxidantes, y micro elementos, pueden ser claves en el proceso (Maldjiana et al, 2005).

2.2.6. SEMEN REFRIGERADO

Con respecto al desarrollo de la IA en Camélidos Sudamericanos (CSA), esta tecnología se limita a la utilización de semen fresco, con una tasa máxima preñez del 77% en los centros de inseminación experimentales y no más que el 50 % de los establecimientos privados (Huanca et al., 2007). La IA con semen refrigerado ha mostrado muy buenos resultados en lo que permite el mejoramiento genético en diferentes especies, este no ha sido el caso de CSA. El único informe de IA con semen refrigerado alpaca es de Vaughan et al. (2003), sin resultados de preñez. Estos autores inseminaron alpacas hembras antes de la ovulación con semen diluido en Triladyl® y se refrigeró a 4 °C durante 24 h. La dosis de inseminación fue 125-170 × 10⁶ espermatozoides con aproximadamente el 45% de motilidad. La falta de éxito de estos resultados no es sólo debido a los problemas en la recolección y evaluación de semen. Otra variable desconocida en estas especies es el intervalo óptimo entre la inducción de la ovulación y la inseminación cuando se utiliza semen refrigerado (Adams et al., 2009).

La falta de información ha restringido la aplicación de semen refrigerado en IA en CSA (Huanca et al.2007). El desarrollo de un protocolo para IA con semen refrigerado permitiría la conservación y el transporte de material genético de una mayor calidad de los animales.

2.2.7. CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

La capacitación es el conjunto de cambios fisiológicos que confieren al espermatozoide la habilidad de poder fecundar un ovocito. En estas modificaciones se incluyen cambios bioquímicos y fisiológicos en donde se alteran y eliminan sustancias que fueron integradas a la membrana plasmática del espermatozoide durante su trayecto por el epidídimo (Visconti y Kopf, 1998).

Los mecanismos moleculares relacionados a la capacitación espermática incluyen la remoción del colesterol de la membrana plasmática (Cross, 1998) por acción de albúmina y esfingomielinas (Cross, 2000); incremento de calcio intracelular; ingreso de bicarbonato al espacio intracelular; y la acción de segundos mensajeros (Visconti

y Kopf, 1998). En ese sentido, durante la capacitación se describe un aumento en la producción de AMPc, desencadenado por la adenil ciclasa e incremento en la fosforilación de proteínas en el residuo tirosina. También es probable que la producción de especies reactivas de oxígeno acelere la fosforilación de proteínas y por lo tanto la capacitación (Herrero et al., 1999; De Lamirande y O'Flaherty, 2008).

2.2.8. EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA

La determinación de la motilidad es una de las pruebas más utilizadas en la valoración de la calidad del semen. Una fuerte y progresiva motilidad es un índice importante de la viabilidad de la población espermática. A pesar que la motilidad se puede medir con la ayuda de sistemas automatizados, normalmente se hace, de forma subjetiva, mediante el examen microscópico realizado por un técnico experimentado (Sorensen, 1991; Illera, 1994).

Las muestras deben ser evaluadas tan pronto como sea posible, considerando la influencia que tienen los cambios de temperatura sobre la motilidad espermática. La técnica consiste en la observación microscópica (40X) de una muestra de semen diluida en una lámina portaobjetos temperada; los espermatozoides aparecen activos con movimiento progresivo y se les puede ver momentáneamente individualizados. Se determina el porcentaje de espermatozoides móviles sobre el total de espermatozoides visualizados (Arthur et al., 1991; Sorensen, 1991; Ax, 2002).

En el caso de camélidos sudamericanos, debido a la característica viscosa del semen, no se aprecia la motilidad masal y la motilidad espermática es estacionaria u ondulante y no progresiva (Bravo et al., 2002).

2.2.9. EVALUACIÓN DE LA VITALIDAD

Los espermatozoides vivos no permiten el ingreso de colorantes supravitales, mientras los muertos los absorben; es decir, la membrana espermática representa una barrera al paso de las mencionadas tinciones al medio intracelular. Este fenómeno biofísico permitió el desarrollo de técnicas orientadas a la diferenciación de los espermatozoides vivos de muertos (Sorensen, 1991). Son varios los colorantes que pueden usarse para la determinación de la vitalidad. Éstos, en su mayoría, son mezclas de eosina y algún colorante de contraste, siendo las más usadas las combinaciones Eosina-nigrosina y Eosina-verde resistente (Sorensen, 1991).

En 1989, Didion et al., reportaron una técnica de doble tinción que permite evaluar la vitalidad y la integridad acrosomal de espermatozoides humanos, de manera simultánea. Esta técnica incluye el uso de un colorante vital, el azul tripán, para la diferenciación de espermatozoides vivos y muertos, y al giemsa para la determinación de la integridad del acrosoma. Así mismo, Santiani et al. (2005) hicieron uso de la referida técnica para la evaluación de espermatozoides de alpaca sometidos a congelación encontrando un efectivo método para la evaluación de la vitalidad y la integridad del acrosoma.

2.2.10. FECUNDACIÓN CON SEMEN REFRIGERADO

El proceso de refrigeración forma parte del proceso de congelación del semen; sin embargo, también puede utilizarse como método de conservación a corto plazo para lo que necesita medios diluyentes adecuados que deben contener componentes específicos, es decir, una solución tampón, sales, azúcares y sustancias que aporten una cierta protección de la membrana contra el descenso de temperatura, como la yema de huevo.

Cuando las células están sujetas a temperaturas inferiores a 0°C, inicialmente "súperrefrigeran". El modo en que recuperan el equilibrio depende del ritmo de refrigeración y de su permeabilidad al agua.

Si el ritmo de enfriamiento es lento o si la permeabilidad al agua es elevada, las células se equilibran por la transferencia del agua intra-celular hacia el hielo externo o sea, se equilibran por deshidratación; pero si son refrigeradas rápidamente o si su permeabilidad al agua es baja, éstas se van equilibrar, en parte, por congelación intracelular. El ritmo de enfriamiento debe, por tanto, tener en cuenta estos fenómenos (Amann. 1987). (Choez. 2010).

Para desarrollar un protocolo que permita obtener preñez mediante inseminación artificial con semen de llama refrigerado durante 24 horas, primeramente, estudiamos la capacidad protectora de diferentes diluyentes sobre la movilidad e integridad funcional de la membrana de espermatozoides refrigerados de llama. Además se observó que en el semen refrigerado, había una correlación positiva entre la variable movilidad espermática y la variable espermatozoides con

membrana íntegra donde se conservó la asociación positiva entre estas dos variables. (Giuliano et al., 2013).

2.2.11. DESARROLLO EMBRIONARIO

A. Segmentación o división embrionaria

Poco después de la fecundación, el cigoto comienza a dividirse a la vez que va recorriendo el oviducto hacia el útero, esto último facilitado por la acción de los esteroides. Los cigotos sufren la primera división celular aproximadamente a las 17-19 horas tras la ovulación (Hunter, 1990). Los embriones mantienen el estadio de 2 células durante 6-8 horas mientras que el estadio de 4 células se prolonga durante 20-24 horas (Flint, 1981), por lo que la mayoría de embriones entran en este estadio en el útero. Durante este proceso, la división se produce sin que aumente la masa celular, a diferencia de las mitosis de las células somáticas.

El estadio de mórula (8-16 células) en la especie porcina se alcanza alrededor del día 4, tomando como día 0 el momento de la ovulación (Hunter, 1990).

Durante el proceso de división, las organelas citoplasmáticas son escasas y están concentradas alrededor del núcleo, mientras que las inclusiones de vitelo llenan las zonas periféricas del citoplasma. Las mitocondrias se elongan en el estadio de mórula, lo que sugiere un incremento en su actividad metabólica. Los nucléolos se observan a partir de estadio de 8 células y éstos se asocian a un incremento en el número de ribosomas (Hunter, 1990).

B. Formación del blastocisto

Tan pronto como el embrión llega a 16 células (dependiendo de la especie), los blastómeros empiezan a formar uniones estrechas unas con otras adoptando una forma circular ligeramente lobulada denominada mórula. Cuando la mórula está formada, los blastómeros empiezan a separarse en 2 poblaciones distintas: las células internas y las externas. Las células de la posición interna desarrollan uniones tipo gap, que por un lado permiten la comunicación intercelular y, por otro, van a mantener agrupado a este conjunto celular. Las células externas van a desarrollar uniones

estrechas ocluyentes, que se producen para modificar las características de permeabilidad. Después de que se hayan formado las uniones estrechas, los fluidos empiezan a acumularse en el interior del embrión. Esta etapa, en la que el embrión aún se encuentra rodeado por la ZP, recibe el nombre de blastocisto y en él se diferencian según su posición dos poblaciones de células: una interna (masa celular interna) que dará origen al embrión propiamente dicho, y otra, la situada periféricamente, que origina el trofoectodermo o trofoblasto, que interviene en la ingestión selectiva de nutrientes y formará posteriormente el corion (Hafez, 2000).

2.3. HIPOTESIS

Ha: Existe capacidad fecundante de espermatozoides refrigerados en la producción de embriones *in vitro* en alpacas Huacaya.

Ho: No existe capacidad fecundante de espermatozoides refrigerados en la producción de embriones *in vitro* en alpacas Huacaya.

2.4. VARIABLES DE ESTUDIO

2.4.1. VARIABLE DEPENDIENTE:

Producción de embriones *in vitro*. (Los porcentajes de división, mórulas y blastocitos en alpacas).

2.4.2. VARIABLE INDEPENDIENTE:

Espermatozoides refrigerados.

2.4.3. DEFINICION OPERATIVA DE VARIABLES

Tabla N° 02: Operacionalización de variables

VARIABLES	DIMENSIÓN	INDICADORES	ESCALA
VARIABLE INDEPENDIENTE: Espermatozoides refrigerados de alpacas.	Tiempo de refrigeración de espermatozoides de alpacas, en dilutor Tris. T = 0 horas T = 4 horas T = 8 horas	% Motilidad % Viabilidad Millones/ml	Prueba de F. significación 0.05%
VARIABLE DEPENDIENTE: Producción de embriones <i>in vitro</i>	Número de células División: de 2-16 células Mórula: entre 16 y 64 Blastocitos: entre 100 a 800 células.	% de división % Mórula % Blastocitos	Prueba de F. significación 0.05%

Fuente: Elaboración propia.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica, ubicado en el Campus Universitario de Paturpampa, a 12° 47' 06" de Latitud Sur y a 74° 58' 17" de Longitud Norte, a una altitud de 3 680 m.s.n.m., con temperatura media de 18.8 °C. Los ovarios y testículos de alpaca fueron recuperados en el Camal Municipal de Huancavelica y trasladados al laboratorio.

3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN:

Básica

3.3. NIVEL DE INVESTIGACIÓN:

Científico - Tecnológico

3.4. METODO DE INVESTIGACIÓN:

Inductivo-deductivo.

3.5. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN:

El trabajo tiene un diseño experimental científico, cuya tabla es la siguiente:

Tabla N° 03: Diseño de Investigación

Tratamientos	Número. de Ovocitos	Dosis
0 Horas	1743	87 x10 ⁶
4 Horas	1872	87 x10 ⁶
8 Horas	2014	87 x10 ⁶

Fuente: Elaboración propia.

3.6. POBLACIÓN, MUESTRA, MUESTREO:

Población: 3020 ovarios (9700 ovocitos) de alpacas hembras, 80 testículos de alpacas machos, beneficiados en el camal Municipal de Huancavelica.

Muestra: 1800 ovarios (7200 ovocitos) de alpacas hembras y 46 testículos de alpacas machos, beneficiadas en el camal Municipal de Huancavelica.

Muestreo:

No probabilístico – Por saturación

La muestra se tomó de manera no probabilística por las características de las mismas, para cuyo efecto, se consideró los criterios: oportunidad y cantidad de beneficios.

3.7. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.7.1. TÉCNICAS

OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRA

Se recuperó ovarios de Alpaca en el camal municipal de Huancavelica, de acuerdo a lo descrito por Palma, (2001).

RECUPERACIÓN DE OVOCITOS

Se obtuvieron los Complejos Cúmulo Ovocitos (COCs) de acuerdo al protocolo descrito por Ratto et al., (2005)

MADURACIÓN DE OVOCITOS SELECCIONADOS

La maduración de los ovocitos se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Ratto et al., (2005) con algunas modificaciones introducidas por Ruiz et al., (2010).

RECUPERACIÓN Y CAPACITACION DE LOS ESPERMATOZOIDES

La recuperación de espermatozoides se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Ratto et al., (2005) con algunas modificaciones,

EVALUACIÓN DE VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES

Se evaluó la viabilidad de espermatozoides según la técnica de acuerdo a la técnica descrita por Chahuayo y Paytan (2013).

EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD DE ESPERMATOZOIDES

Se evaluó la motilidad de espermatozoides según la técnica Sorensen (1991).

DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

Se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Rivera (1997).

FECUNDACIÓN DE OVOCITOS

La fecundación *in vitro* se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Ratto et al., (2005).

CULTIVO *in vitro* DE EMBRIONES

Luego de la inseminación, los ovocitos se cultivaron de acuerdo al protocolo descrito por Martínez et al., (2007).

3.7.2. INSTRUMENTOS

RECUPERACIÓN, MADURACIÓN DE OVOCITOS SELECCIONADOS

Ficha de recuperación, maduración de ovocitos

Ficha para obtención de muestra.

EVALUACION, RECUPERACIÓN Y CAPACITACION DE LOS ESPERMATOZOIDES

Ficha de evaluación de viabilidad, motilidad, concentración de espermatozoides

FIV, CULTIVO *in vitro* DE EMBRIONES.

Ficha de FIV, cultivo de embriones *in vitro*.

3.8. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

A continuación detallaremos los procedimientos específicos.

3.8.1. PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO*

A) Obtención y transporte de muestra

Se recuperó ovarios de alpaca en el camal municipal de Huancavelica, y fueron llevados en termos a temperatura ambiente al Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Huancavelica, dentro de las tres horas siguientes al sacrificio de los animales (Santayana. 2012).

B) Recuperación de ovocitos

Se obtuvieron los Complejos Cúmulo Ovocitos (COCs) de acuerdo al protocolo descrito por Ratto et al., (2005) mediante punción de folículos de 2 a 4 mm de diámetro, con una aguja de 21G y una jeringa de 5 ml.

El líquido folicular fue depositado en una placa petri a 37°C. Luego se agregó de 3 a 5ml de IVM, dependiendo de la cantidad de líquido folicular.

Después se lavaron en promedio de 5 gotas de medio IVM de 150 μ l cada uno.

La selección de los COCs se realizó de acuerdo a Ratto et al., (2005), con la ayuda de una micropipeta, bajo una lupa estereoscópica. Se trabajó de acuerdo a la recomendación de Sacha D. y Rojas R. (2009), con COCs de categoría 1 y categoría 2 para madurar *in vitro* ovocitos dando mejores resultados frente a COCs de la categoría 3 y 4.

C) Maduración de ovocitos seleccionados

La maduración de los ovocitos se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Ratto et al., (2005) con algunas modificaciones introducidas por Ruiz et al., (2010). Se maduraron ovocitos *in vitro* por 40 horas en gotas de 50 μ l (8-10 COCs/gota) en una cámara modular con atmósfera húmeda de 5% CO₂, 90% de humedad a 38.5 °C, usando un medio de cultivo de tejido (TCM-199) suplementado con piruvato de sodio 0.2 mM, sulfato gentamicina 50 ug/ml, FSH 0.02 unidades /ml, estradiol 17- β 1 ug/ml y suero fetal bobino al 10%, cubiertas con aceite mineral en placas de cultivo de 35 x 10 mm.

D) Recuperación y capacitación de los espermatozoides

Se obtuvo espermatozoides a partir de testículos de alpaca macho (superiores a 3 cm de diámetro) sacrificados en el Camal Municipal de Huancavelica y transportados al laboratorio en termos a una temperatura ambiente.

La recuperación de espermatozoides se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Ratto et al., (2005) con algunas modificaciones, se separó los conductos deferentes y el epidídimo del testículo, previo lavado de estos con suero fisiológico (SSF) 0.9% más gentamicina atemperados a 37°C, posteriormente se depositó en una placa petri y adicionándole 1 ml de dilutor TRIS de la fracción A, se procedió a realizar cortes transversales del epidídimo y hacer el ordeñado de estos. Luego se depositó en un eppendorf de 1.5 ml y se llevó a centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos, obteniendo un pellet en el fondo del eppendorf. Se retiró el sobrenadante seguidamente

se agregó 500 µl de la fracción A, se llevó a la incubadora a una temperatura de 37°C por 5 minutos y enseguida se llevó a la refrigeradora a una temperatura de 4°C por 5 minutos y luego se agregó 800 µl de TRIS de la fracción B. Se dejó en la refrigeradora por 4 y 8 horas.

Para la capacitación de espermios se realizó mediante la técnica de swin up: cumplido el tiempo de refrigeración, se llevó a centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos, obteniendo un pellet en el fondo del eppendorf. Se retiró la sobrenadante dejando el pellet y luego se agregó 1 ml de FERT-TALP. Finalmente se llevó a la incubadora en una posición de 45° durante 45 minutos a 90% de humedad y 5% de CO₂.

- **Evaluación de viabilidad de espermatozoides**

Se evaluó la viabilidad de espermatozoides a post refrigeración de las muestras por medio de coloración con eosina nigrosina, sobre un portaobjeto colocando 10 µl de colorante y 10 µl de espermatozoide diluido, de esta forma se mezcló y se dejó sobre una platina temperada a 37°C durante dos minutos antes de realizar un frotis con otro portaobjeto; luego se puso sobre platina temperada durante 1 minuto para su respectiva fijación, luego se contó 500 células en microscopio de contraste de fases con objetivo de 40X, considerando como vivos a los espermatozoides que no aceptaron el colorante (transparente) y como muertos a los coloreados.

- **Evaluación de la motilidad de espermatozoides**

La evaluación de motilidad individual se realizó en el microscopio invertido utilizando objetivo de 40X, colocando una gota de 10µl de muestra en un portaobjeto para su respectiva observación de motilidad individual y se calificó en forma subjetiva por un mismo evaluador en un mínimo tiempo (1 minuto) considerando como porcentaje de espermatozoides con motilidad normal; los que mostraron un patrón de movimiento vigoroso, progresivo y homogéneo. La evaluación se realizó para cada tratamiento: 00, 04 y 08 horas antes y después de la refrigeración de espermatozoides. (Sorensen, 1991).

- **Determinación de concentración de espermatozoides**

Se utilizó un hemocitómetro (cámara de Neubauer), micropipetas de 10 y 1000 microlitros. Para lo cual se colocó en un eppendorf de 1 ml, 990 microlitros de agua destilada y 10 microlitros de semen, para así poder obtener una dilución de 1: 100. Para ser evaluado en la cámara Neubauer, donde se realiza el conteo respectivo con el objetivo 40X. (Rivera, 1998).

$$[\] \Sigma = \# \text{ de espermatozoides} \times 50 \times 100 \times 1000 = \text{Espermatozoides/ml}$$

Dónde:

= La suma de espermatozoides.

50 = Superficie contada en la cámara de Neubauer.

100 = Es el grado de dilución del semen.

1000 = transformación de mm^3 a ml.

El resultado final se multiplica por la cantidad de eyaculado en ml.

E) Preparación de los ovocitos

Después del tiempo de maduración *in vitro* (40 horas), los ovocitos se lavaron y depositaron en gotas de FERT-TALP. El medio de fecundación se dispuso en 45 μl , en placas petri estériles de 35x10 mm. Las microgotas se cubrieron totalmente con aceite mineral y fue llevado a la incubadora de CO_2 a 38.5 °C para luego ser inseminadas. En cada microgota se colocaron de 8 a 10 ovocitos maduros.

F) Fecundación de ovocitos

La fecundación *in vitro* se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Ratto et al., (2005). A cada gota de fecundación se añadió 3 μl en promedio de suspensión de espermatozoides capacitados, con una concentración final aproximada de 87×10^6 espermatozoides/ml, los ovocitos y espermatozoides se mantuvieron juntos, en la incubadora durante 18 horas a 38.5°C, 90% de humedad y 5% de CO_2 .

G) Cultivo *in vitro* de embriones

Luego de la inseminación, los ovocitos se cultivarán de acuerdo al protocolo descrito por Martínez et al., (2007), por 7 días en gotas de 50 µl de medio fluido oviductal sintético suplementado con 3 mg/ml de BSA, a partir del segundo día se adiciona glucosa al (SOF-IVC) y se hizo el cambio de placa respectivo, repitiendo este procedimiento cada dos días.

3.8.2. EVALUACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

La evaluación se realizó cada dos días durante el proceso de cultivo.

El desarrollo embrionario se evaluó de acuerdo a la tasa de división celular, así se dividió en:

- ✓ **División (día 2-4):** De 2 a 16 células.
- ✓ **Mórula temprana (día 5):** El cigoto presenta aproximadamente entre 16 y 32 células, su forma es similar a la de una mora en la cual es posible distinguir individualmente a los blastómeros. Su masa celular ocupa casi todo el espacio perivitelino.
- ✓ **Mórula compacta (día 5-6):** Aproximadamente entre 32 y 64 blastómeros. Éstos están unidos y constituyen una masa compacta que ocupa sólo el 60 a 70% del espacio perivitelino.
- ✓ **Blastocisto temprano (día 7):** Aproximadamente entre 100 y 200 células. Se caracteriza por el comienzo del transporte de fluido en las células trofoectodérmicas y por la formación de una cavidad (blastocelo) en el interior del embrión, dando la apariencia de un anillo de sello. El blastocisto temprano ocupa 70-80% del espacio perivitelino. Es posible diferenciar el trofoblasto de la masa celular interna.
- ✓ **Blastocisto expandido (día 7-8):** Más de 200 células. El diámetro aumenta considerablemente, con el consecuente adelgazamiento de la zona pelúcida a un tercio de su espesor original. Los embriones que llegan a este estadio generalmente se degeneran por deshidratación.
- ✓ **Blastocisto protruido (día 8-9):** Aproximadamente entre 200 y 800 células. Los embriones han abandonado la zona pelúcida. Su forma puede ser esférica, con un blastocelo bien definido o colapsado

3.9. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

En el trabajo realizado se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA).

Esta investigación tiene el siguiente diseño experimental

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

Los componentes del modelo son:

Y_{ij} = Observaciones (% mórulas y % de blastocistos).

μ = Media general.

T_i = Efecto de los tratamientos (Tiempo de refrigeración de espermatozoides de alpacas).

e_{ij} = Error asociado a cada observación.

Los datos obtenidos en la producción de embriones *in vitro* y evaluación de espermatozoides son expresados en porcentajes para el análisis de varianza (ANOVA) de acuerdo a Herrera J. y Carse L. (2000). Se utilizó la prueba de Tuckey para contrastar la diferencia entre promedios ($p < 0.05$). Los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico Sas v. 9.2 para Windows.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

4.1.1. Estadísticos descriptivos de división, mórula y blastocisto.

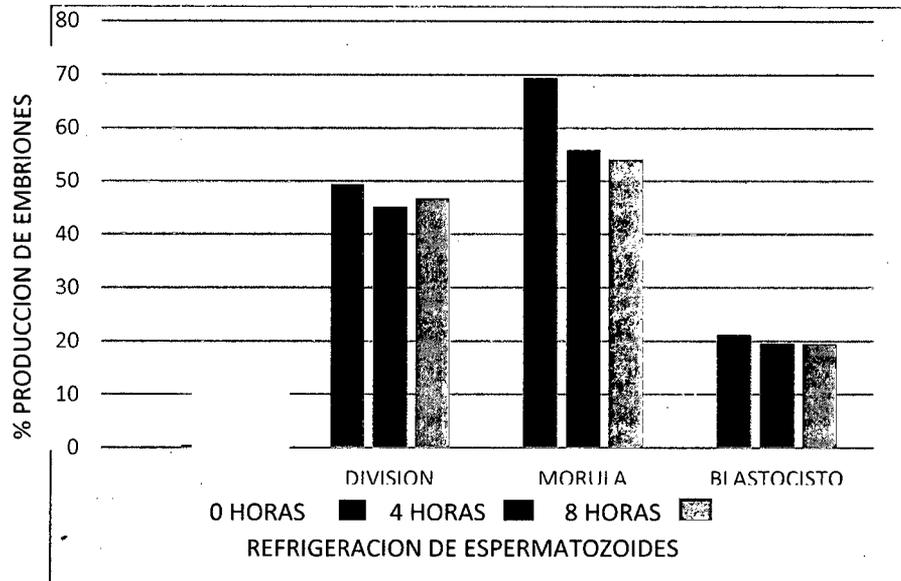
En la tabla N° 03 y grafico N° 01 se presentan los promedios de división, mórula y blastocistos de alpacas obtenidos en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica en el presente estudio.

Tabla N°04. Promedio (desviación estándar) de la división (DIV), mórula (MOR) y blastocisto (BLAST) durante los tiempos de refrigeración.

FACTOR	N *	DIV	MOR	BLAST
T. Horas		[0.1186]	[0.001]	[0.5014]
0 Horas	42	48 ± 3.00 ^a	67.69 ± 8.94 ^a	20.67 ± 4.24 ^a
4 Horas	41	45.10 ± 9.09 ^b	55.81 ± 12.20 ^b	19.62 ± 5.76 ^a
8 Horas	41	45.57 ± 7.75 ^b	52.99 ± 15.06 ^c	19.13 ± 7.68 ^a

*: Entre corchetes se encuentran los p-valores que evalúan la significación del tiempo en horas sobre las variables estudiadas. *: n: Número de lecturas. *: a, b y c indica diferencia de medias de los tratamientos con respecto al tiempo de refrigeración:

Grafico N° 01: Porcentaje de producción de embriones en los diferentes tiempos de refrigeración de espermatozoides de alpaca



Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 04 se observa que la división hay diferencia significativa entre 0 y los tratamientos de 4 y 8 horas a la prueba de Tuckey. En mórulas hay diferencia significativa entre 0, 4 y 8 horas a la prueba de Tuckey y en la evaluación de blastocistos no hay diferencia entre 0 horas, 4 horas y 8 horas a la prueba de Tuckey.

Los resultados de la prueba de ANOVA, indican que el promedio y la desviación estándar. En 0 horas fue de 48.13 ± 3.44 para división, 67.69 ± 8.94 para mórula y 20.67 ± 4.24 para blastocisto; en 4 horas fue de 45.10 ± 9.09 para división, 55.81 ± 12.20 para mórula y 19.62 ± 5.76 para blastocisto; En 8 horas fue de 45.57 ± 7.75 para división, 52.99 ± 15.06 para mórula y 19.13 ± 7.68 para blastocisto.

Tabla N° 05: Evaluación de espermatozoides

Tiempo	N°	Viabilidad %	Motilidad %	Concentración Espermatozoides/ml
0 horas	30	77.83 ^a	79.87 ^a	104.53 x 10 ⁶ a
4 horas	30	64.46 ^b	70.50 ^b	81.23 x 10 ⁶ b
8 horas	30	60.00 ^c	61.67 ^c	74.46 x 10 ⁶ c

Fuente: Elaboración propia

Durante la evaluación de espermatozoides refrigerados se observa que en 0 horas se obtienen mayores resultados tanto de vitalidad 77.83%, motilidad 79.87% y concentración 104.53 x 10⁶ espermatozoides/ml. Mientras que en 8 horas de refrigeración se tienen menor vitalidad 60%, motilidad 61.67% y concentración de 74.46 x 10⁶ espermatozoides/ml.

4.2. DISCUSIÓN

Durante la evaluación de los espermatozoides refrigerados a 5 °C y diluidos en TRIS, en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica, se obtuvieron los siguientes resultados, para viabilidad en 0 horas fue de 77.83%, 4 horas 64.46% y 8 horas 60.00%; para motilidad en 0 horas 79.87%, 4 horas 70.50% y para 8 horas 61.67%; para concentración en 0 horas 104.53 x 10⁶ espermios/ml, 4 horas 81.23 x 10⁶ espermios/ml, para 8 horas 74.46 x 10⁶ espermios/ml. Al comparar nuestros resultados con los citados por otros autores, podemos observar nuestros resultados son superiores a los de Chahuayo y Paytan (2013), durante su evaluación de espermatozoides de alpaca refrigerados a 0, 4, 8, 12, 24 y 48 horas, con el dilutor TRIS obtuvieron en promedio de viabilidad de 56,6%, motilidad de 55,9% y una concentración de 78 x 10⁶ espermios/ml. Mientras que con los estudios realizados por Vaughan et al. (2003) sus resultados muestran diferencias en motilidad y concentración con los nuestros (espermatozoides epididimarios y FIV), ya que utilizó en Inseminación Artificial semen refrigerado de alpaca a 4 °C durante 24 horas, diluido en Triladyl, la dosis de inseminación fue 125-170 x 10⁶ espermatozoides con aproximadamente 45% de motilidad.

En cuanto a la evaluación de embriones de alpaca producidos por FIV en cultivo de SOF IVC, los resultados obtenidos fueron: en 0 horas 48.13% para división, 67.69% para mórula y 20.67% para blastocisto; en 4 horas se obtuvo 45.10% para división, 55.8% para mórula y 19.62% para blastocisto; En 8 horas 45.57% para división, 52.99% para mórula y 19.13% para blastocisto. Estos resultados son superiores a los estudios realizados por Conde et al., (2008), en la producción de embriones de llamas *in vitro* obteniendo 17%, (16/94) de blastocistos expandidos y recientemente producido un 15% (5/33) blastocistos expandidos después del cultivo en DMEM-F12 (Trasorras et al., 2010). En contraste, Del Campo et al. (1994) informaron de un 4,7% de cigotos que llegaron a la fase de blastocito y, en otro estudio se obtuvo un 9% de blastocistos eclosionados tras 6 días de cultivo con SOF (Trasorras et al., 2010). Gamarra et al. (2008) lograron obtener 1% de

blastocistos eclosionados de alpaca (3/262), mediante FIV a partir de ovocitos de matadero y espermatozoides de epidídimo congelados. Trasorras et al., (2011).

Gamarra et al., 2008, realizo fecundación *in vitro* en alpacas, congelo espermatozoides epididimarios diluidos en solución TRIS fructosa con 10% de glicerol. La dosis de inseminación fue 10×10^6 de espermatozoides/gota, donde obtuvieron 27.1% de segmentación, 8% de mórula y 3% de blastocisto eclosionado. Al comparar nuestros resultados fueron mejores ya que obtuvimos 46.27% de división, 58.63% de mórula y 19.81% de blastocisto respectivamente, cabe mencionar que usamos glicerol al 7 %, dicha diferencia puede ser debido a que Gamarra et al., 2008, realizo trabajos de congelación mientras nosotras solo refrigeramos.

CONCLUSIONES

- Existe capacidad fecundante de espermatozoides refrigerados para la producción de embriones *in vitro* en alpacas (*Vicugna pacos*) en el estadio de mórula, pero en los estadios de división y blastocisto no influye el efecto del tratamiento.
- Se puede refrigerar por 4 y 8 horas espermatozoides para la producción de embriones *in vitro* de alpaca.
- La calidad espermática (motilidad, vitalidad y concentración) es mejor a las 4 que en 8 horas de refrigeración.
- El desarrollo embrionario fue mejor a las 0 horas (testigo), que a las 4 y 8 horas.

RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios para la implementación de un protocolo validado para inseminación artificial con semen refrigerado o criopreservado en camélidos sudamericanos.
2. Inseminar *in vitro* con semen refrigerado hasta 8 horas, ya que se obtuvieron resultados favorables en el presente trabajo. Pero después de confirmar la ovulación, e inseminar con una dosis mayor a la utilizada con semen fresco, para asegurar preñez.
3. Realizar trabajos de investigación para ir perfeccionando el proceso de producción de embriones *in vitro* para ser aplicarlo en campo.
4. Realizar este método de refrigeración en el laboratorio para aprovechar que hay días en que en el camal municipal se encuentran buenos testículos con altos porcentajes de motilidad, viabilidad y concentración para realizar FIV, ya que en ocasiones escasean los mismos; para continuar la producción de embriones en el laboratorio.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Adams, G.; Ratto M.; Huanca, W.; Singh, J. 2009. Ovulation Q Inducing Factor in the Seminal Plasma of Alpacas and Llamas. *Biol Reprod.* 73: 452 – 457.
2. Aller J. F; Rebuffi G. E., Cancino A. K. Alberio R. H. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (lama glama). Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de mar de la plata. Argentina. *Arch. Zootecnia* Pp. 15-52.
3. Amann R. P., Schanbacher B.D. 1987. Physiology of male reproduction. *J. Anim.Sci.*, Vol 57, Suppl. 2: 380-403.
4. Anel L, Gerra C, Alvarez M, Anel E, Martinez A, Boixo C, Kaabi M, Herraes P, Paz P. 2002. Effect of postmortem interval in quality of epididymal spermatozoa in Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Theriogenology* 57: 577.
5. Arthur G, Noakes D, Pearson H. 1991. Reproducción y Obstetricia veterinaria. 6o ed. Madrid: McGraw-Hill. 601-635 p.
6. Ax, R.; Dally M.; Didion B.; Lenz R.; Love, C.; Varner, D.; Hafez, B.; Bellin, M. 2002. Evaluación del semen. En: Hafez, E.S.E. y Hafez, B. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. México. McGrawQHill. p 519
7. Ayuque A. et al., 2013. Evaluación de diferentes tiempos para la maduración nuclear de ovocitos de llama (*Lama glama*) en el desarrollo de embriones producidos por fecundación *in vitro*. Tesis FCI. EAPZ-UNH Huancavelica. Perú.
8. Bearden J. and Fuquay W. 1997. Applied Animal Reproduction. 4th. Edition. A Simon & Schuster Company. Upper Saddle River, NJ. p. 351.
9. Berland, M.; Von Baer, A.; Parraguez, V.; Morales, P.; Adams, G.; Silva, M.; Ruiz, J. and Ratto, M. 2010. *In vitro* fertilization and embryo development of cumulus oocyte complexes (COCs) collected by ultrasound guided follicular aspiration in llamas treated with gonadotropin. 36th Annual Conference of the IETS/23rd Annual Meeting SBTE. Córdoba – Argentina.
10. Bols P., Van Soom A., Ysebaert M., Vyenheede J. and Knrit A. 1996. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on *cumulus* oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*.45:1001-1014.

11. Brackett B. 1985. *In vitro* oocytes maturation and fertilization. J. Anim. Sei 61:14.
12. Brackett B. 1988. Aplicaciones de la fertilización *in vitro*. Avances en Zootécnia. Ed. Acribia. Zaragoza, España, p. 159.
13. Bravo, W. 2000. The effect of enzymes on semen viscosity in llamas and alpacas. Small ruminant research 38, 91-95.
14. Bravo, W. 2002, the reproductive process of South American camelids. Printed by Seagull Printing, Salt Lake City. USA.
15. Carrasco Días S. (1ra ed.) (2005). Metodología de la Investigación Científica. Perú: Editorial San Marcos.
16. Chahuayo y Paytan. 2013. Influencia de los dilutores tris, sp-talp y andromed sobre la viabilidad de espermatozoides epididimarios refrigerados de alpacas (Lama pacos). Tesis FCI. EAPZ-UNH Huancavelica. Perú.
17. Chaves M, Miragaya M, Capdevielle E, Rutter B, Guliano S, Agüero A. 2003. Maduración *in vitro* de oocitos de vicuña obtenidos por aspiración quirúrgica de folículos de ovarios superestimulados. III Congreso de la Asociación Latinoamericana de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. ALEPRYCS. Viña del Mar – Chile.
18. Choez, K. 2010. Criopreservación de semen en camélidos sudamericanos. UNMSM. Lima – Perú.
19. Choi Y., Takagi M., Kamúhita H., Wijayagunawardane M., Acosta T., Miyazawa K. and Sato K. 1998. Effects of follicular fluid on fertilization and embryonic development of bovine oocytes *in vitro*. Theriogenology. 49:1103.
20. Conde P, C Herrera, MG Chaves, SM Giuliano, A Director, VL Trasorras, M Pinto, MI Carchi, D Stivale, B Rutter, A Agüero, MH Miragaya, RS Pasqualini 2006 *In vitro* production of llama embryos by IVF or ICSI. *Reproduction, Fertility and Development* 19 (1) Pages 237 – 238.
21. Conde, P.; Herrera, C.; Trasorras, V.; Giuliano, S.; Director, A.; Miragaya, M.; Chaves, M.; Carchi, M.; Stivale, D.; Quintans, C.; Agüero, A.; Rutter, B. and Pasqualini, S. 2008. *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Animal Reproduction Science*. 109, pp. 298 - 308.

22. Cox, J.; Hormazábal, J. and Santa María, A. 1993. Effect of the cumulus on *in vitro* fertilization of bovine matured oocytes. *Theriogenology*. Vol. 40, pp. 1259-1267.
23. Cross NL. 1998. Minireview: Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 59:7- 11.
24. Cross NL. 2000. Sphingomyelin modulates capacitation of human sperm *in vitro*. *Biol Reprod* 63:1129-1134.
25. Cupps P. 1987. *Reproduction in Domestic Animals*. 4th. Edition. Academic Press, Inc. San Diego Calif 679 p.
26. Dale B. and Elder K. 1997. *In vitro* fertilization. Cambridge University Press, p. 18.
27. Del Campo M., Del Campo C., M Donoso, M Berland, R Mapletoft. 1994. *In vitro* fertilization and development of (*Lama glama*) oocytes using epidymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology* 41: 1219 – 1229.
28. Del Campo MR, C.H Del Campo, GP Adams and RJ Mapletoft. 1995. The application of new reproductive technologies to South American Camelids. *Theriogenology* 43: 21-30.
29. Didion BA, Dabrinsky J, Giles J, Graves CN. 1989. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res* 22:51-57.
30. First, N.L. y J.J. Parrish 1987. - *In vitro* fertilization in ruminants. *J. Reprod. Fert.* (Suppl. 34): 151- 165.
31. Flint A. 1981. An unifying hypothesis for the control of blastocyst growth based on observations on the pig. *J. Reprod. Fert.*; 29:215-227.
32. Francois J., Michael A. and Marc-Yré Sirard. 1997. Role of the cyclic Adenosine monophosphate-dependent protein kinase in the control of meiotic resumption in bovine oocytes cultured with thecal cell monolayers. *Biology of Reproduction*.56:1363.
33. Gamarra, G.; Huamán, E.; León, S.; Carpio, M.; Alvarado, E. y Vivanco, W. 2008. Primeros embriones *in vitro* de alpaca obtenidos por Maduración (MIV), Fertilización (FIV) y cultivo *in vitro* provenientes de ovarios del camal. XXXI Reunión Científica Anual de la Asociación peruana de Producción Animal. Octubre.

34. Gentry, A; Clutton, J; Groves, C. 2004. The naming of wild species and their domestic derivatives. *Journal of Archeological Science* 31:645-651.
35. Giuliano S. 2013. Inseminación Artificial con Semen Refrigerado en Llama. *SPERMOVA*. 2013; 3(2): 142 – 145.
36. Gómez C, MH Ratto, M Berland, M Wolter, GP Adams. 2002. Superstimulatory response and oocyte collection in Alpacas. *Theriogenology* 57:584 (abstract).
37. Griffin E. and Ojeda R. 1992. *Textbook of Endocrine Physiology*. 2nd, Edition. Oxford University Press. New York, Oxford, pp. 351.
38. Hafez B. 2000. Foliculogénesis, maduración del óvulo y ovulación. En: Hafez ESE, Hafez B (eds), *Reproducción e inseminación artificial en animales*. México: Mc Graw-Hill Interamericana, 70-83.
39. Huanca, W. y Gaulty, M. 2001. Conservación de semen refrigerado de llamas. *Rev. Inv. Vet. Perú*. Nº 1: 460-464.
40. Huanca, W.; Cordero, A.; Huanca, T. y Adams, G. 2007. Biotecnologías reproductivas en Camelidos Sudamericanos domesticos: avances y perspectivas. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* Vol. 15.
41. Huanca, W.; Cárdenas, O.; Huanca, T. y Cordero, A. 2009. Respuesta Ovárica a la Estimulación Hormonal en Llamas Prepúberes. *Memorias de la XXV Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal*. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Chiclayo Perú. p. 542-550.
42. Huamán E, Ticlliacuri F. 2011. Efecto de la atmosfera de cultivo sobre el desarrollo de embriones de alpaca producidos por fecundación *in vitro*. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú.
43. Herrera J. y Carse L. 2000. *Guía de aplicación de pruebas estadísticas en el programa systat 7.0 para ciencias biológicas y forestales*. Cuarta edición. Santa Cruz. Bolivia
44. Herrero MB, De Lamirande E, Gagnon C. 1999. Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation *in vitro*. *Biol Reprod* 61:575-581.
45. Hunter R. 1990. Fertilization of pig eggs in vivo and *in vitro*. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement 40: 211-226.

46. Illera M. 1994. Reproducción de los animales domésticos. 1° Edición. España: AEDOS. 175p.
47. Linnaeus, C von. 1758. Systema Naturae per Regna tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis. 10 ed. Laurentii Salvii. 824 p.
48. Machicado, R.; Delgado, P. y Flores, M. 2009. Descripción del proceso de fertilización *in vitro* de ovocitos de llama (*Lama glama*) obtenidos por súper estimulación ovárica con eCG y fertilizados con semen tratado con proteasa. V Congreso Mundial sobre Camélidos. Riobamba, Ecuador.
49. Maldjiana A; Pizzic, F; Gliozzic, T; Cerolinib, S; Pennya, P; Noblea, R. 2005. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen Theriogenology 63, 411–421.
50. Martínez M., Gatica R., Correa J. y Eyestone W. 2007. Gestaciones producidas con embriones bovinos clonados por transferencia nuclear. Arch Med Vet 39: 59-62.
51. Massip A. 2003. Cryopreservation of bovine oocytes: current status and recent developments. Reprod. Nutr. Dev. 43: 325-330.
52. Mendoza, J.; Ayuque, A.; Triviño, F.; Ayuque, G.; Landeo, L. y Ruiz, J. 2008. Evaluación de dos métodos de recuperación de espermatozoides epididimarios para la fecundación *in vitro* de ovocitos de alpaca. Efecto de la exposición a etilenglicol sobre el desarrollo partenogénico *in vitro* de ovocitos de alpaca. XXXI Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Lima.
53. Mendoza, J.; Landeo, L.; Yauri, M.; Manrique, L.; Molina, R.; Castañeda, F.; Contrearras J.; Ruiz, J. 2013. Experiencias preliminares de gestación en alpacas y llamas con transferencia de embriones de alpacas producidas *in vitro*
54. Mermillod P., Oussaid B. and Cognié Y. 1999. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. Journal of Reproduction and Fertility, v.54, p.449-460.

55. Miragaya M., Chaves M., Capdevielle E., Ferrer M., Pinto M., Rutter B., Neild D. and Agüero A. 2002. *In vitro* maturation of llama (*Lama glama*) oocytes obtained surgically using follicle aspiration. *Theriogenology* 57 (1): 731.
56. Palma GA. 2001. Producción *in vitro* de embriones. En Palma GA. Primera edición. *Biotecnología de la Reproducción*. Pp 225-282. INTA Balcarce.
57. Parrish, J.J., J.L. Susko – Parrish, M-L. Leibfried-Rutledge, E.S. Critser, W.H. Eyestone y N.L. First 1986. – Bovine *in vitro* fertilization with frozen – thawed semen. *Theriogenology* 25:591 - 600.
58. Pérez, M.; Apaza, E.; Deza, H. 2006. Congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de camélidos en el buffer tris con diferentes proporciones de yema de huevo y glicerol. II simposio internacional de investigación sobre camélidos sudamericanos. Arequipa – Perú. Pp. 221.
59. Pieterse M., Kappen K., Kruij A. and Taveræ M. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning on the ovaries. *Theriogenology*. 30:751.
60. Pineda González Estefanía; Pinilla Arenas Silvia María, 2007. Comparación de dos diluyentes (lactosa-glicerol-yema de huevo; inra-dformamida-yema de huevo) en la preservación de semen; trabajo para optar al título de médico veterinario; Universidad de la Salle Facultad de Medicina Veterinaria Bogotá D.C; pág. 19.
61. Quispe Peña, E.; Poma Gutierrez, A. y Purroy Unanua, A. (2013). Características productivas y textiles de la fibra de alpacas de raza huacaya. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*; 7(1): 1-29.
62. Ratto M., Wolter M., Gomez C., Berland M. and Adams G. 1999. *In vitro* maturation of llama oocytes. Libro de resúmenes. *II Congreso Mundial sobre Camélidos*. Cuzco-Perú.
63. Ratto M., Berland M., Huanca W., Singh J. and Adams G. 2005. *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes. *Theriogenology* 63: 2445-2457.
64. Ratto M, C Gómez, M Berland, G Adams. 2007. Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Animal Reproduction Science* 97: 246-256.

65. Rivera, E. 1998. Uso de la yema de huevo y la glicerina en la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca. Tesis FMVZ-UNA Puno. Perú.
66. Ruiz J., Correa J., Ayuque G., Landeo L., Yaranga M. y Zacarías A. 2007. Producción *in vitro* de embriones partenogénéticos de alpaca y llama. I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú. 20 - 22 de noviembre.
67. Ruiz J.A., y J.E. Correa. 2007. Maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca y llama aspirados vía laparoscópica. I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos.
68. Ruiz J., Correa J. y Martínez M. 2010. Vitricación de ovocitos bovinos y su uso en el desarrollo partenogénético de embriones. Arch Med Vet 42: 79-83.
69. Sacha D, Rojas R. 2009. Influencia de la categoría del ovocito en la producción de embriones partenogénéticos de alpaca (*Vicugna pacos*) en Huancavelica. Perú.
70. Saeki, K., M.L. Leibfried-Rutledge y N.L. First 1990. Are fetal calf serum and hormones necessary during *in vitro* maturation of cattle oocytes for subsequent development. Theriogenology 33: 316.
71. Santayana P. 2012. Tiempo de maduración de ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca" en el desarrollo embrionario por fecundación *in vitro*, Huancavelica 2011. Tesis de Biólogo. UNSCH.
72. Santiani A; Huanca W; Sapana R; Huanca T; Sepulveda N; Sanchez R. 2005. Effects on the quality of frozen thawed. Alpaca (*vicugna pacos*). And extenders. Asian j. androl o vol.7, pp 303-309
73. Santiani A. 2012. Uso de dos Análogos de Superóxido Dismutasa para prevenir la Desestabilización Espermática Prematura durante la Criopreservación y Vitricación en espermatozoides de Alpaca. Tesis de Post grado Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
74. Sansinema M., Taylor S., Taylor P., Denniston R. and Godke R. 2003. Production of Nuclear Transfer Llama (*Lama glama*) Embryos From *in vitro* matured llama oocytes. Cloning Stem cells 5, 191-198.

75. Scott F. 1994. *Developmental Biology*. 4th. Edition. Sunderty, Massachusetts, p.894.
76. Shamsuddin M., Larsson B. and Rodríguez-Martínez H. 1993. Maturation related changes in bovine oocytes under different culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 31:49.
77. Sorensen A. 1991. Evaluación de la aptitud reproductiva., ed. Reproducción animal, principios básicos y prácticas. 1ª ed. McGraw-Hill. p 124-143.
78. Sumar, J. 1997. Avances y perspectivas en reproducción de camélidos. I Symposium Internacional Avances en Reproducción de Rumiantes. Lima. p 30.
79. Trasorras, V., Giuliano, S., Chaves, M., Baca Castex, C., Carretero, V., Negro, A., Rodríguez, D., Miragaya, M., 2010. Producción *in vitro* de embriones de llamas. In: Segundas Jornadas del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, Buenos Aires, Argentina.
80. Trasorras V. 2012. *In vitro* production of embryos in South American camelids. *Animal Reproduction Science* 136 (2013) 187– 193.
81. Van Soom A., Tanghe S., De Pauw I., Maes D. and De Kruif A. 2002. Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reprod. Dom. Anim.* 37: 144-151.
82. Vaughan Jane, Galloway D. and Hopkins David, 2003. Artificial Insemination en alpacas (*Lama pacos*). Rural Industries research and Development Corporation. Australia. Pp. 67-72.
83. Visconti, P.E. y Kopf, G.S. 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 59:1-6.
84. Westendorf P, Richter L, Treu H. (1975). Deep freezing of boar sperm laboratory and insemination results using the Hulsenbergerpaillete method. *DtschTierarztlWochenschr* 82, 261–267.
85. Zhang, L.; Jiang, S.; Wozniak, P.; Yang, X. and Godke, R. 1995. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and early embryo development *in vitro*. *Mol. Rep. Dev.* Vol. 40, pp. 338 - 344.

ANEXOS

17

ANEXO N° 1. MEDIOS UTILIZADOS PARA LA MADURACIÓN *in vitro* DE OVOCITOS

A) TCM-199 de trabajo o stock para IVM

Componentes	Cantidad/50 ml
TCM-199 polvo(M 5017)	0.75 g
NaHCO ₃	0.11 g
HEPES	0.298 g
Agua mili Q	completar hasta 50 ml

Duración un mes a 4° C.

B) Suplemento del medio de IVM

Componentes	Concentración	Volumen/10 ml
TCM-199 de trabajo	90%	9 ml
FCS	10%	1ml
FSH ¹	0.02 unid./ml	10 µl (stock)
Piruvato de sodio ²	0.2 mM	20 µl (stock)
Gentamicina ³	50 µg/ml	10 µl (stock)
Estradiol 17-β ⁴	1 µg/ml	10 µl (stock)

Usar dentro del día de preparación

1. FSH stock: 20 A.U. FSH/1000 µl de suero fisiológico.
2. Piruvato de sodio stock: 11 mg ácido pirúvico/1000 µl de suero fisiológico.
3. Gentamicina stock: Sulfato de gentamicina 50 mg/1000 µl de suero fisiológico.
4. Estradiol stock: Estradiol 17-β 5 mg/5000 µl de etanol absoluto.

C) Insulina stock

Componentes	Cantidad/100 ml
Ácido acético	10 μ l
Insulina	1 mg
Agua Mili Q	1 ml

ANEXO N° 2. MEDIOS UTILIZADOS PARA LA FECUNDACIÓN *in vitro* DE OVOCITOS

A) Medio SP-TALP (medio de lavado y capacitación de espermios)

Componente	Concentración	100 ml (mg)	μ l stock sales
NaCl	100 Mm	584.4 mg	2500 μ l - 4 M
KCl	3.1 mM	23.1 mg	310 μ l - 1 M
NaHCO ₃	25 mM	210 mg	--
NaH ₂ PO ₄	0.3 mM	3.6 mg	300 μ l - 0,1 M
Lactato de Na	21.6 mM	368 μ l	--
Ca Cl ₂ x 2H ₂ O	2 mM	29.4 mg	200 μ l - 1 M
Mg Cl ₂ x 6H ₂ O	0.4 mM	8.1 mg	399 μ l - 0,1 M
HEPES	10 mM	238 mg	--
Rojo Fenol	(1%) 100 μ l; (0.5%) 200 μ l		--

Titular pH = 7,4, Mantener refrigerado (15 a 30 días)

B) Suplemento de medio SP-TALP

SUPLEMENTO : Para 10 ml de Medio

(agregar antes de filtrar para usar)

Piruvato Na 1.0 mM	10 μ l
Gentamicina 50 μ g/ml stock	10 μ l
BSA F V (A-8022)	6 mg/ml

Filtrar 0,22 μ m

Incubar al menos 2 horas antes de usar

Medio FERT-TALP (Medio de fecundación)

Componente (mM)	Concentración	100 ml (mg)	µl stock sales
NaCl	114 mM	666 mg	2849 µl - 4 M
KCl	3.2 mM	23.8 mg	319 µl - 1 M
NaHCO ₃	25 mM	210 mg	--
NaH ₂ PO ₄	0.4 mM	4.8 mg	400 µl - 0,1 M
Lactato de Na	10 mM	187 ul	--
Ca Cl ₂ x 2H ₂ O	2 mM	29.4 mg	200 µl - 1 M
Mg Cl ₂ x 6H ₂ O	0.5 mM	10 mg	492 µl - 0,1 M
HEPES	--	238 mg	--
Rojo Fenol	--	(1%) 100 µl; (0,5%) 200 µl	

Titular pH = 7,4, Mantener refrigerado (15 a 30 días)

C) Suplemento para FERT-TALP

SUPLEMENTO: Para 10 ml de medio	
(agregar antes de filtrar para usar)	
Piruvato Na	0.2 mM 10 µl
Gentamicina	50 µg/ml stock 10 µl
BSA Sigma (A-6003)	6 mg/ml

Filtrar 0.22 µm
Temperar antes de usar
Al inseminar agregar heparina

D) Stock A

Componentes	Concentración	Cantidad/100 ml	Cantidad/50 ml
NaCl	107.7 mM	6.294 g	3.147 g
KCl	7.16 mM	0.534 g	0.267 g
NaH ₂ PO ₄ (2H ₂ O)	1.19 mM	0.162 g	0.081 g
CaCl ₂ (2H ₂ O)	1.71 mM	0.2514 g	0.1257
MgCl ₂ (2H ₂ O)	0.49 mM	0.0996 g	0.0498 g
Rojo fenol (0,5%)	--	100 µl	50 µl
Agua mili Q	--	Completar hasta 100 ml	completar hasta 50 ml

Duración un mes a 4° C

E) Stock B

Componentes	Concentración	Cantidad/100 ml	Cantidad/50ml
NaHCO ₃	37 mM	1.3 g	0.65 g
Rojo fenol (0,5%)	--	100 µl	50 µl
Agua mili Q		Completar hasta 100 ml	Completar hasta 50 ml

Duración un mes a 4° C

F) Fluido Sintético del Oviducto Modificado, m3OF

Componentes	Concentración	Volumen /100 ml	Volumen /50 ml
Stock A	--	10.0 ml	5.0 ml
Stock B	--	16.2 ml	8.1 ml
Piruvato de Sodio	0.33 mM	3.6 mg	1.8 mg
L-glutamina	1 mM	14.6 mg	7.3 mg
Glucosa	1 mM	18 mg	9.0 mg
Glicina	5 mM	37.5 mg	18.75 mg
Taurina	5 mM	62.5 mg	31.25 mg
Lactato de sodio 60% ¹	3.3 mM	47 µl (stock)	23ul (stock)
BME ²	50 x	2 ml	1 ml
MEM ³	100 x	1 ml	0,5 ml
Insulina ⁴	10 µg/ml	100 µl (stock)	50ml (stock)
Sulfato de gentamicina ⁵	50 µg/ml	100 µl (stock)	50ml (stock)
Agua mili Q		Completar hasta 100 ml	completar hasta 50 ml
BSA Sigma A-6003	3 mg/ml	---	---

Duración una semana a 4 ° C

1. Lactato de Sodio stock: 600 µl lactado de sodio/400 µl de agua Mili Q.
2. BME: 12 aminoácidos esenciales para medio base Tagle.
3. MEM: 7 aminoácidos no esenciales para medio esencial mínimo.
4. Insulina stock: insulina 1 mg/10 µl ácido acético/1000 µl de agua Mili Q.
5. Gentamicina stock: Sulfato de gentamicina 50 mg/1000 µl de suero fisiológico.

G) Solución de Hialuronidasa

Componentes	Cantidad/10ml
PBS (-) 10x o Sof Hepes	1 ml
Agua mili Q	9 ml
Hialuronidasa	10 mg

Almacenar a -20°C alícuotas de 0.5ml

DILUTOR TRIS YEMA FRUCTOSA**SOLUCIÓN TRIS BUFFER**

COMPONENTES	VOLUMEN	
	100 ml.	50 ml.
TRIS	3.605 gr.	1.35 gr.
ÁCIDO CÍTRICO	2.024 gr.	1.012 gr.
FRUCTOSA	1.488 gr.	0.744 gr.
PENICILINA	50000 UI	2500 UI (5 µl)
GENTAMICINA	50 µl	50 µl
AGUA BIDEESTILADA	Completar hasta 100 ml	Completar hasta 50 ml
ROJO FENOL	100 µl	50µl

Ajustar pH con Hidróxido de Sodio (pH = 7.2 - 7.4)

FRACCIÓN A.

COMPONENTES	14 ml
TRIS BUFFER	11.2 ml.
YEMA DE HUEVO (20 %)	2.8 ml.

FRACCIÓN B.

COMPONENTES	5ml
TRIS (FRACCIÓN A)	4.650 ml.
GLICEROL (7%)	0.350 ml.

BASE DE DATOS

0 HORAS - TESTIGO

Total	División	Mórula	Blastocisto	No Dividido
41	19	13	3	6
42	21	13	5	3
42	21	16	3	2
41	20	14	4	3
35	17	13	4	1
40	20	14	5	1
54	27	20	6	1
44	20	13	5	6
36	17	12	4	3
35	18	12	3	2
37	17	14	4	2
26	14	9	3	0
40	18	13	5	4
37	21	10	4	2
26	14	8	3	1
43	21	12	6	4
47	20	16	5	6
56	26	14	4	12
32	15	10	5	2
43	22	15	4	2
35	19	10	4	2
46	23	12	3	8
41	20	14	4	3
44	22	16	5	1
43	19	15	4	5
42	21	13	4	4
46	21	15	5	5
31	15	10	3	3
54	27	15	4	8
33	15	12	3	3
41	20	14	4	3
56	25	18	5	8
51	22	16	3	10
38	18	12	3	5
40	21	13	4	2
44	19	10	3	12
35	17	12	3	3
54	25	15	6	8
43	22	15	4	2
50	22	16	5	7
41	17	14	4	6

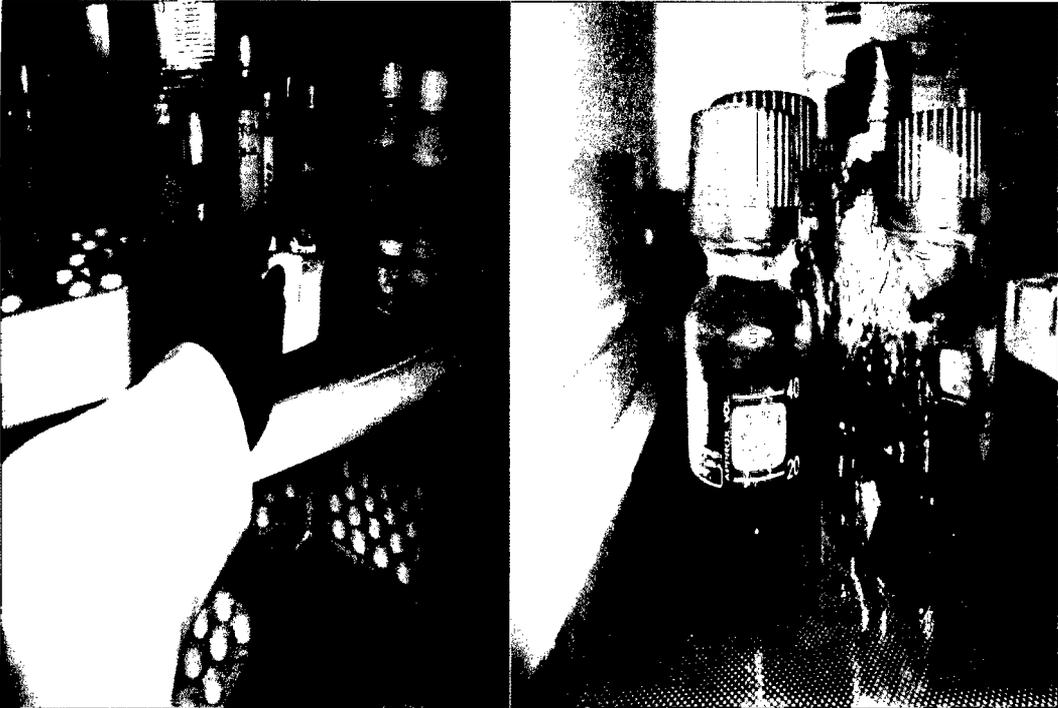
9

RESULTADOS 4 HORAS				
Total	División	Mórula	Blastocisto	No Dividido
51	16	10	4	21
33	17	11	4	1
24	12	8	2	2
55	28	13	5	5
40	24	11	5	0
28	17	8	2	1
32	19	8	3	2
33	10	7	2	14
36	20	10	5	1
35	16	13	4	2
54	28	11	3	6
38	21	7	2	4
47	11	9	3	24
45	19	9	3	14
57	29	11	4	13
50	27	12	5	6
49	19	12	4	8
48	24	14	6	4
30	15	7	2	6
37	16	10	5	6
51	21	13	4	13
48	17	12	3	16
42	13	7	3	19
50	15	10	5	20
41	21	11	3	6
45	23	10	4	8
56	20	14	5	17
43	19	13	4	7
45	16	11	4	14
38	15	10	3	10
57	25	16	5	11
59	28	15	5	11
55	29	12	3	11
42	18	11	5	8
35	16	9	3	7
54	25	13	4	12
61	30	15	5	11
57	28	15	4	10
57	29	10	3	15
62	25	16	6	15
52	16	7	4	25

RESULTADOS 8 HORAS				
Total	División	Mórula	Blastocisto	No Dividido
41	18	13	3	7
26	11	8	4	3
34	14	9	2	9
65	28	12	5	20
51	29	11	5	6
44	21	9	4	10
32	12	8	3	9
28	15	9	3	1
49	18	10	5	16
47	16	13	4	14
68	28	11	3	26
38	16	9	5	8
31	11	9	3	8
26	9	8	4	5
64	41	11	4	8
58	33	10	3	12
69	25	14	4	26
60	32	13	3	12
30	17	10	2	1
37	19	12	4	2
51	19	14	5	13
48	26	11	3	8
33	16	9	3	5
35	19	7	3	6
61	32	12	3	14
56	25	14	4	13
56	27	11	4	14
47	21	13	6	7
55	22	15	5	13
36	14	9	4	9
67	28	13	5	21
66	36	12	4	14
55	27	11	4	13
69	37	12	4	16
60	28	13	5	14
54	21	10	4	19
61	30	13	5	13
57	19	11	3	24
57	25	13	5	14
62	22	11	4	25
30	15	7	3	5

FOTOGRAFIAS

Fotografía 1. Componentes de los medios de maduración y fecundación



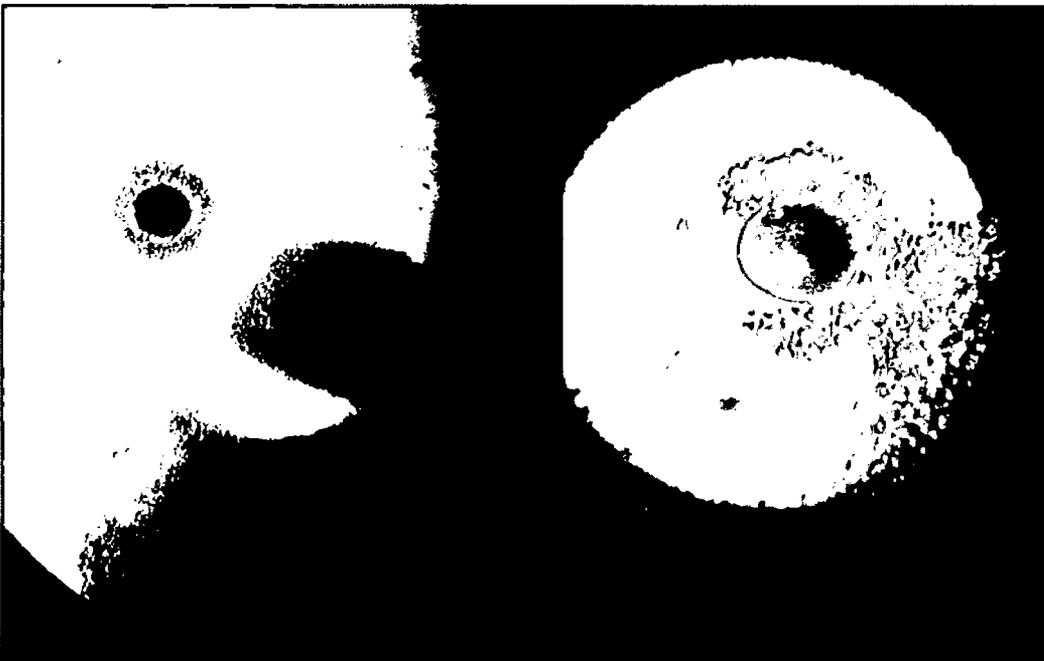
Fotografía 2. Ovario de alpaca con folículos



Fotografía 3. Aspiración folicular de ovarios de alpaca. Jeringa de 10 ml con aguja 21G



Fotografía 4: CCOs seleccionados de Alpaca para la maduración *in vitro*



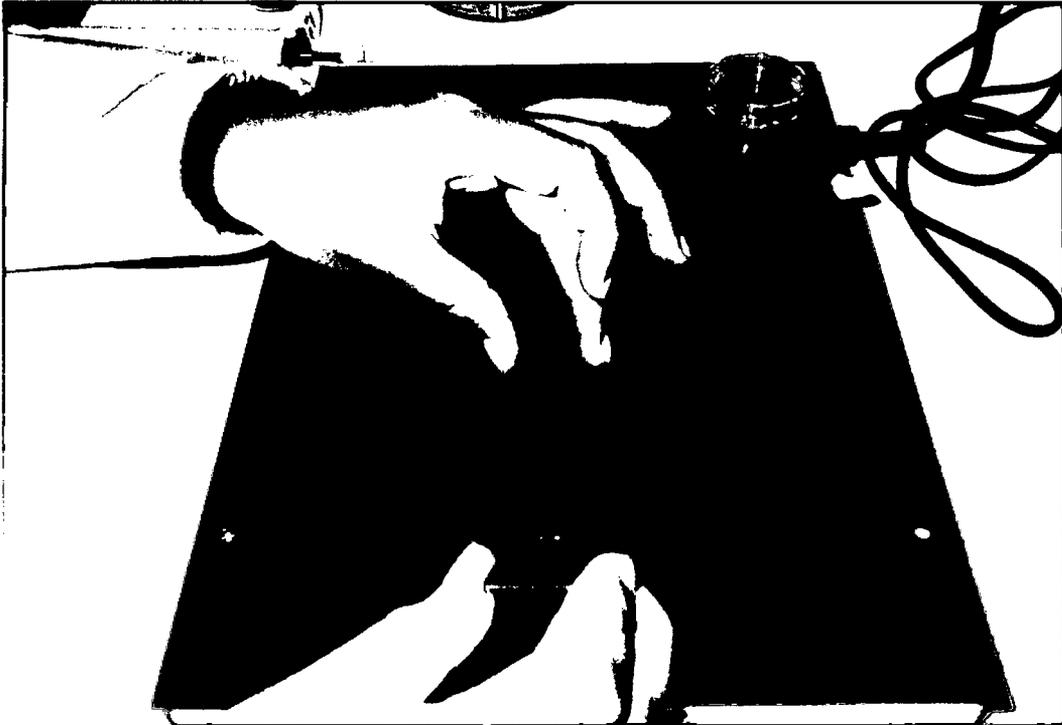
Fotografía 5. Maduración de ovocitos a 38.5 ° C, en la cámara de CO₂



Fotografía 6. Ordeñando espermatozoides epididimarios en TRIS



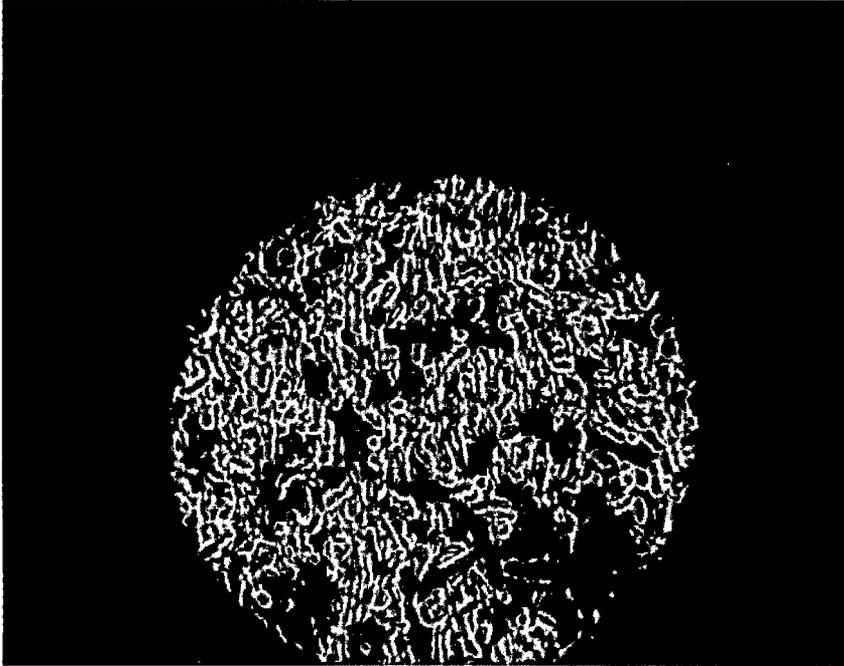
Fotografía 7. Realizando frotis para determinar el porcentaje de vitalidad



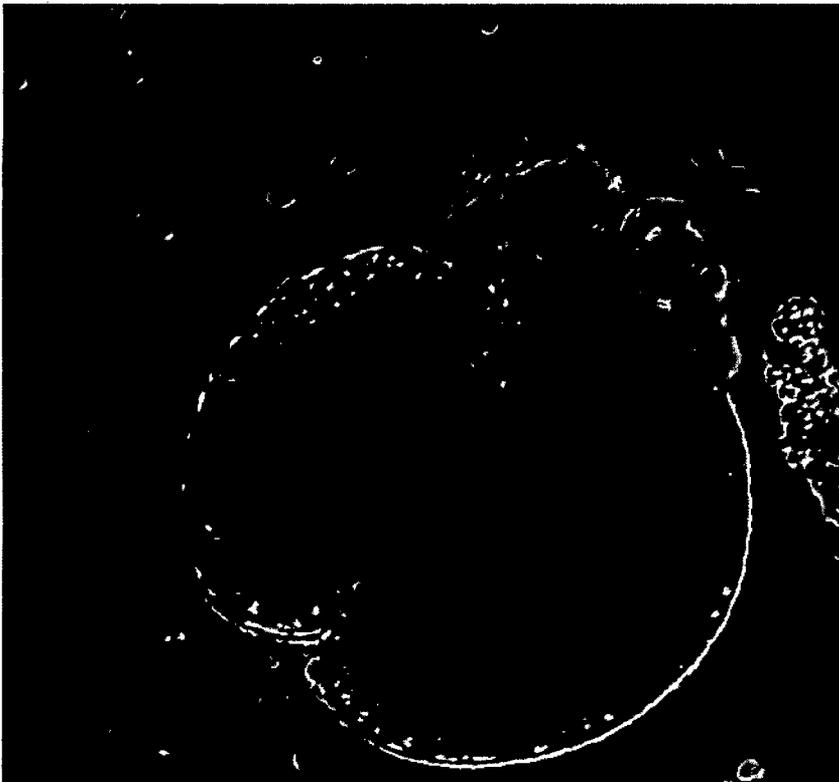
Fotografía 8. Evaluando la viabilidad de los espermatozoides refrigerados a las 4 horas.



Fotografía 9. Evaluación del porcentaje de motilidad de espermatozoides en el microscopio invertido



Fotografía 10. Embrión de 2 blastómeros a tres días de la fecundación *in vitro*



Fotografía 11. Mórula de 5 días, después de la fecundación *in vitro*

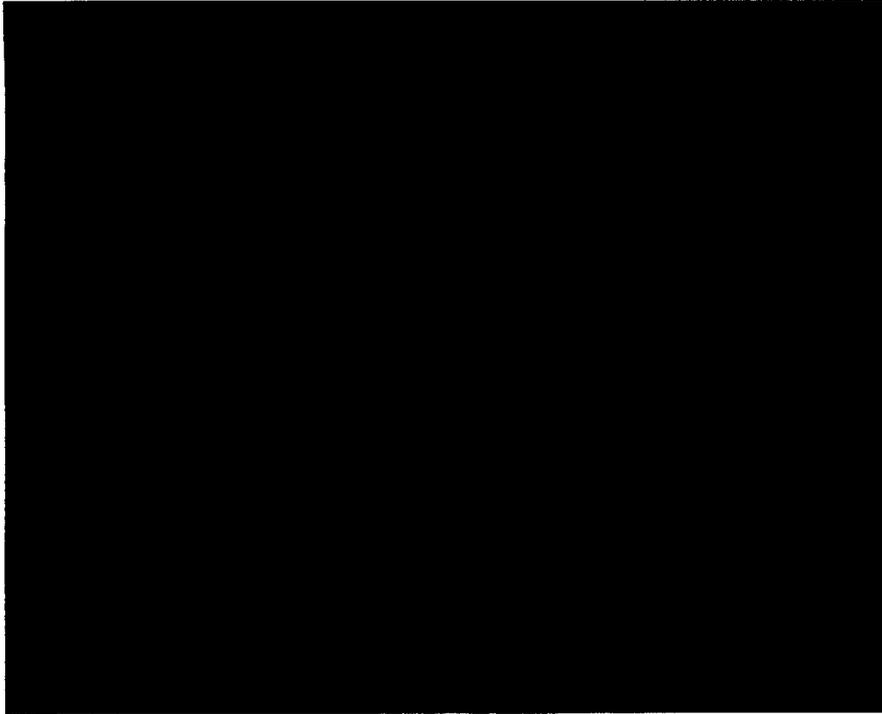


Fotografía 12. Mórula compacta de 6 días después de la fecundación *in vitro*



1

Fotografía 13. Blastocisto de 7 días, después de la fecundación *in vitro*



Fotografía 14. Blastocisto de 8 días

