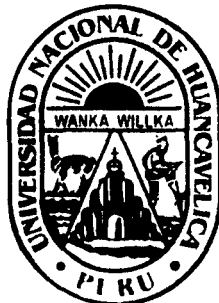


UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCABELICA

(Creada por Ley N° 25265)



**FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE ZOOTECNIA**

TESIS

**“EVALUACIÓN DE DIFERENTES TIEMPOS PARA LA
MADURACIÓN NUCLEAR DE OVOCITOS DE LLAMA
(*Lama glama*) EN EL DESARROLLO DE EMBRIONES
PRODUCIDOS POR FECUNDACIÓN IN VITRO”**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
BIOTECNOLOGIA REPRODUCTIVA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO ZOOTECNISTA**

PRESENTADO POR:

Bach. AYUQUE ARAUJO, Alex

Bach. JUSTINIANO HUAMANCAYO, Edwin Ciro

Asesor:

Dr. RUIZ BEJAR, Jaime Antonio

**HUANCABELICA - PERÚ
2013**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCAMELICA

FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En el Auditorium de la Facultad de Ciencias de Ingeniería, a los 25 días del mes de junio del año 2013, a horas 2:30 p.m, se reunieron los miembros del Jurado Calificador conformado por los siguientes: **Ing. Marino ARTICA FÉLIX (PRESIDENTE)**, **M.Sc. Rufino PAUCAR CHANCA (SECRETARIO)**, **Ing. Yola Victoria RAMOS ESPINOZA (VOCAL)**, **Dra. María Del Carmen DURAN MAYTA (ACCESITARIA)** designados con la Resolución de Consejo de Facultad N° 003-2012-FCI-COyG-UNH, de fecha 22 de octubre del 2012, y ratificados con la Resolución de Decano N° 197-2013-FCI-UNH de fecha 18 de junio del 2013, a fin de proceder con la evaluación y calificación de la sustentación del informe final de tesis titulado: "EVALUACIÓN DE DIFERENTES TIEMPOS PARA LA MADURACIÓN NUCLEAR DE OVOCITOS DE LLAMA (*Lama glama*) EN EL DESARROLLO DE EMBRIONES PRODUCIDOS POR FECUNDACIÓN IN VITRO", presentado por los Bachilleres **Alex Ayuque Araujo y Edwin Ciro Justiniano Huamancayo**, 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... 3:45 p.m, se invitó al público presente y a los sustentantes abandonar el recinto. Luego de una amplia deliberación por parte de los Jurados, se llegó al siguiente resultado:

Alex AYUQUE ARAUJO

APROBADO



POR... MAYORIA

DESAPROBADO



Edwin Ciro JUSTINIANO HUAMANCAYO

APROBADO



POR... MAYORIA

DESAPROBADO



En conformidad a lo actuado firmamos a continuación:

Presidente

Vocal

Secretario

Vº Bº Decano

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

Alex.

Dedico este trabajo, a mi familia
que es el pilar fundamental en mi
formación y desarrollo profesional.

Edwin.

AGRADECIMIENTOS

- 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 vuestra formación profesional.
- A nuestros padres por su apoyo incondicional en lo moral y económico.

Los Tesistas

ÍNDICE

CARÁTULA.....	01
DEDICATORIAS.....	02
AGRADECIMIENTOS.....	03
ÍNDICE.....	04
RESUMEN.....	06
CAPITULO I: PROBLEMA.....	08
1.1. Planteamiento del problema.....	08
1.2. Formulación del problema.....	11
1.3. Objetivos.....	11
1.4. Justificación e importancia.....	11
CAPITULO II: MARCO TEORICO Y CONCEPTUAL.....	13
2.1. Antecedentes.....	13
2.2. Bases teóricas	16
2.2.1. Ovogénesis.....	16
2.2.2. Fecundación <i>in vitro</i>	25
2.2.3. Selección de espermatozoides.....	27
2.2.4. Desarrollo embrionario.....	29

CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS	31
3.1. Lugar de ejecución.....	31
3.2. Materiales y equipos.....	31
3.3. Metodología.....	35
3.4. Procedimiento de recolección de datos.....	40
3.5. Análisis estadístico.....	42
CAPITULO IV	43
RESULTADOS	43
DISCUCIONES	50
CONCLUSIONES	52
RECOMENDACIONES	53
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	54
ANEXOS	64

RESUMEN

La investigación se ha realizado en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica ubicado en el distrito, provincia, región de Huancavelica a 3680 m.s.n.m. con el objetivo de determinar el tiempo óptimo de maduración nuclear de ovocitos de llama (*Lama glama*) en el desarrollo de embriones producidos por fecundación *in vitro*, para el que se recuperaron 1100 ovocitos de 178 ovarios (89 llamas) de animales que fueron beneficiados en el camal municipal de Huancavelica; se 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 25mM, 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, 5% O₂ y 90% N₂, 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, se realizó la fecundación *in vitro* y se evaluó el desarrollo embrionario, para lo cual se procedió a madurar los ovocitos del mismo modo que en el ensayo anterior, conservando los tiempos de 28, 36 y 42 horas. Se recuperaron espermatozoides epididimarios en medio Sperm-TALP para luego ser lavados y seleccionados mediante la técnica de Swim-up, se utilizó 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, se obtuvo los porcentajes de segmentación, mórula y blastocisto (51.00±3.31%, 71.47±2.49% y 11.64±1.30%) respectivamente para 36 horas y el porcentaje de segmentación, mórula y blastocisto (49.55±3.56%, 76.69±2.90% y 12.51±2.22%) respectivamente para 42 horas, sin encontrarse diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p > 0.05$). Se concluye 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, bajo las condiciones del presente estudio.

Palabras claves: ovocitos, maduración *in vitro*, metafase II, fecundación *in vitro*, llama.

CAPITULO I

PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial la población estimada de llamas es de 3'321 000 millones y el Perú cuenta con una población de 1'104 000 millones (32,5%) de las cuales en la región Huancavelica existen más de 130,068 llamas. En el Perú la llama, es criado como un animal de carga, producción de carne, también se emplea su fibra en la textilería regional, se aprovecha sus pieles y cueros, existen dos variedades de llamas la pelada o k'ara y la lanuda o chaku (CONACS, 2004).

En los países andinos, los camélidos sudamericanos probablemente constituyen el único medio de utilización productiva de las extensas áreas de pastos naturales de zonas alto andinas, donde no es posible la agricultura ni la crianza económica de otras especies de animales domésticos. Estos animales convierten con inusual eficiencia, los pastos pobres de estas alturas en productos de alta calidad como son la fibra y la carne. Sin embargo, problemas como sistemas inadecuados de crianza, escasos criterios de mejoramiento genético y fallas de cuidados sanitarios afectan

tanto la producción de fibra como de carne y disminuyen los ingresos económicos de los productores (Quispe y col., 2008).

En la actualidad, la explotación de camélidos sudamericanos se realiza con sistemas tradicionales manteniéndose los problemas de morbilidad, mortalidad y baja eficiencia reproductiva (Cárdenas y col., 1999); donde las tasas de natalidad anual en la mayoría de explotaciones es del orden del 47% (CONACS, 2004), con índices de fertilidad (Apaza y col, 1998) y preñez (Apaza y col., 2001) inferiores a 65% y 60% respectivamente; con un reemplazo inadecuado para la reproducción, desconocimiento de la fisiología reproductiva e inapropiado empleo de reproductores en el apareamiento (Apaza y col, 1998).

La aplicación de biotecnologías reproductivas puede contribuir a superar estos bajos índices y aportar al mejoramiento genético en estas especies, sobre todo en la multiplicación de animales de alto valor productivo mantenidos en núcleos genéticos y estos se convertirían en reproductores para los criadores de llamas y de esta manera contribuir al mejoramiento de los ingresos de los criadores de llamas de esta región del país (Ruiz. 2007).

En investigaciones anteriores distintos autores trabajaron en: llamas 36 horas (Del Campo y Col. 1992, Ratto y col. 1999. 2005); 30 horas (Del campo y Col. 1994, Ratto y Col. 1999, 2005, Miaragaya y Col. 2002, Sancinema. 2007, Ruiz y Correa. 2007), 28 horas (Rattoy col. 2005), Ruiz y Col. 2007).En alpacas 27 horas (Ruiz y Correa. 2007); 26 horas (Gomez y Col. 2002; Ratto y col. 2007); 25 – 26 horas (Ruiz y Col. 2007), Gamarra y Col (30 horas).En vicuñas 27 horas (Chaves y Col. 2003), la tasa

de ovocitos que alcanzaron la metafase II fue diferente debido a que no se sabe exactamente cuál es el tiempo óptimo de maduración *in vitro* de ovocitos de llama para obtener una mayor tasa de desarrollo embrionario.

Por otro lado se han producido embriones por fecundación *in vitro* en camélidos sudamericanos (Del Campo y col. 1994, Del Campo et al 1995, Gómez y col. 2002, Conde y col. 2006, Conde y col. 2007, Ratto y col. 2007 y Gamarra y col. 2008. Sin embargo hasta la fecha no ha nacido en el mundo cría alguna de camélidos sudamericanos con la aplicación de esta tecnología. Es necesario entonces mayores estudios, que nos permitan obtener *in vitro* embriones de camélidos sudamericanos de mayor calidad para que puedan ser transferidos satisfactoriamente en hembras receptoras y lograr gestaciones por primera vez en camélidos sudamericanos.

A pesar de ello muy pocos estudios han sido conducidos sobre este tema, uno de ellos es el tiempo óptimo de maduración *in vitro* de ovocitos que es el punto de partida para una eficiente fertilización; este tiempo aún no está definido ya que por investigaciones anteriores se encontró diferencias entre cada autor, tal es el caso de lo reportado por Huanca y col. (2009), Ruiz y Correa (2007).

Frente a esto surge la interrogante: ¿en la maduración *in vitro* en ovocitos de llama existirá un tiempo óptimo y que tenga una mayor influencia en el desarrollo embrionario después de la fecundación *in vitro*?

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Problema principal

¿Cuál es el tiempo óptimo para la maduración nuclear de ovocitos de llama en el desarrollo de embriones producidos por fecundación *in vitro*?

Problemas secundarios:

¿Cuál es el tiempo óptimo (28, 36 y 42 horas) que requiere un ovocito de llama para llegar a la madurez nuclear (metafase II)?

¿Cuál es el tiempo óptimo de maduración para un mejor desarrollo de embriones de llamas producidos por fecundación *in vitro*?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el tiempo óptimo de maduración nuclear de ovocitos de llama (*Lama glama*) en el desarrollo de embriones producidos por fecundación *in vitro*.

1.3.2. OBJETIVO ESPECIFICO

Determinar el tiempo óptimo (28, 36 y 42 horas) que requiere un ovocito de llama para llegar a la madurez nuclear (metafase II).

Determinar el tiempo óptimo de maduración para un mejor desarrollo de embriones de llama producidos por fecundación *in vitro*.

1.4. JUSTIFICACIÓN

Las llamas hembras tienen la limitante de producir menos de 6 crías durante toda su vida productiva. Lo que limita el mejoramiento genético en esta especie. Por otro lado, con la aplicación de la fecundación *in vitro* en bovinos se obtienen entre 70-80 crías/año de la misma hembra donante. Sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado

la gestación de una cría producida por fecundación *in vitro* en camélidos sudamericanos. En parte porque existen pocos grupos de investigación en esta área, lo que hace necesario mayor investigación en donde hasta la fecha no se ha transferido un embrión producido por fecundación *in vitro*.

En el presente trabajo de investigación se pretende establecer el tiempo óptimo de maduración y producción de embriones por fecundación *in vitro* (FIV) de llamas, para lo cual se trabajara con ovarios de camal hasta establecer el tiempo óptimo para la maduración y fecundación *in vitro* (FIV) de ovocitos de llamas, para que en un futuro se pueda extraer de una llama de excelente calidad genotípicamente como fenotípicamente.

Al establecer la técnica adecuada en la producción de embriones por maduración *in vitro* (MIV) y fecundación *in vitro* (FIV) permitirá al productor, tener una alternativa en la mejora de su rebaño acortando tiempo y dinero para lograr un rebaño de excelente calidad que le brinde mejores posibilidades de vida.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

Complejo cúmulos ovocitos (COCs) de llama fueron madurados *in vitro* por primera vez por Del Campo y col. (1992), utilizando un tiempo de 36 horas de maduración en medio tissue culture médium-199 (TCM-199) suplementado con suero fetal bovino, piruvato de sodio, hormona foliculo estimulante (FSH), estradiol y sulfato de gentamicina, obtuvieron 62% de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II. En otro experimento, Del Campo y col. (1994) obtuvieron 30% de ovocitos en metafase II luego de 30 horas de maduración *in vitro* (MIV).

Asimismo, Ratto y col. (1999) utilizando un protocolo similar de MIV mejoraron sustantivamente los resultados anteriores. En este trabajo evaluaron 26, 30 y 36 horas de maduración *in vitro* de COCs de llama y obtuvieron 58%, 73% y 75% de ovocitos que alcanzaron la metafase II con extrusión del primer corpúsculo polar sin diferencias estadísticas. Por otro lado, Miragaya y col. (2002) utilizaron un tiempo de 27-30 horas para la maduración de COCs utilizando un medio diferente a los casos anteriores, el cual estaba compuesto por TCM-199 con bicarbonato, 10% de suero

fetal bovino y glutamina; obtuvieron 62% y 74% de ovocitos en metafase II en llamas en las cuales se recuperó los COCs sin superovulación y con superovulación respectivamente.

En otro estudio, Ratto y col. (2005), utilizando un medio de maduración consistente de TCM-199 suplementado con piruvato de Na 0,2 milimolar (mM), sulfato de gentamicina 25 µg/ml, FSH 0,5 µg/ml, estradiol 17-β 1µg/ml y suero fetal bovino al 10%, encontraron 77,7%, 80,6% y 80,4% de COCs maduros cuando utilizaron 28, 30 y 36 horas para la MIV de COCs de llama sin diferencias estadísticas entre los 3 tiempos evaluados. Por otro lado, Sansinema y col. (2003) para la MIV de COCs de llama introdujeron hormona luteinizante(LH) en su protocolo de maduración, así el medio de maduración estuvo compuesto por TCM-199, 5 µg/ml de FSH, 10 µg/ml de LH, 1 mg/ml de estradiol 17b y 10% de suero fetal bovino, y obtuvieron 52% de ovocitos maduros. Posteriormente el mismo grupo de investigación (Sansinema y col. 2007) utilizaron un medio diferente para la MIV de ovocitos de llama consistente de TCM-199, 5 µg/ml de FSH, 10 µg/ml de LH, 10 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de IGF-1 y 1µg/ml de estradiol 17b y 10% de suero fetal bovino, mejorando su anterior resultado con 74% de ovocitos en metafase II luego de 30 horas de MIV.

Huaman y Ticlliacuri. (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.

También se han madurado con éxito ovocitos de vicuña y alpaca. (Chaves y col. 2003), reportaron la primera maduración *in vitro* de ovocitos de vicuña. Utilizaron un tiempo de 27 horas para la maduración en un medio similar al utilizado por Miragaya y col. (2002) consistente de TCM-199 con bicarbonato, 10% de suero fetal bovino y glutamina; y obtuvieron 41% de maduración nuclear con extrusión del primer cuerpo polar y la totalidad de los ovocitos presentó maduración citoplasmática finalizado el tiempo de cultivo en medio de maduración. En alpacas, Gómez y col. (2002) y Ratto y col. (2007) han utilizado 26 horas para la maduración *in vitro* de ovocitos recuperados por laparotomía ventral. Gómez et al (2002) obtuvo 46% y 40% de ovocitos en metafase II en alpacas donantes superovuladas con FSH y eCG respectivamente.

Por otro lado, Ruiz y Correa (2007) maduraron ovocitos de alpaca y llama durante 27 y 30 horas respectivamente en un medio compuesto por TCM-199 suplementado con piruvato de Na 0,2 mM, sulfato de gentamicina 50 µg/ml, FSH 0,02 unidades/ml, estradiol 17-β 1µg/ml y suero fetal bovino al 10%. Obtuvieron tasas de 75% y 100% de ovocitos maduros de llama y alpaca respectivamente.

En otro estudio Huanca y col. (2009), utilizando un medio de maduración TCM-199 suplementado con 10% FCS (v: v) más 0.5 µg mL⁻¹ FSH, 10 µg mL⁻¹hCG, 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 horas 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 horas.

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 y col., 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 y col. (1993), mencionan que en comparación con las células somáticas, las cuales normalmente miden 10 μm , este proceso además de largo, es extremoso en lo que respecta al incremento de tamaño del ovocito. En la mujer del tamaño original de 10 μm llega a un tamaño final de 80 μm , en la ratona de 20 a 70 μm , etc.

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

Posteriormente, se van formando algunos espacios celulares llamados antros foliculares, los cuales se van llenando con un líquido rico en hormonas esteroideas, 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 y col., 1998).

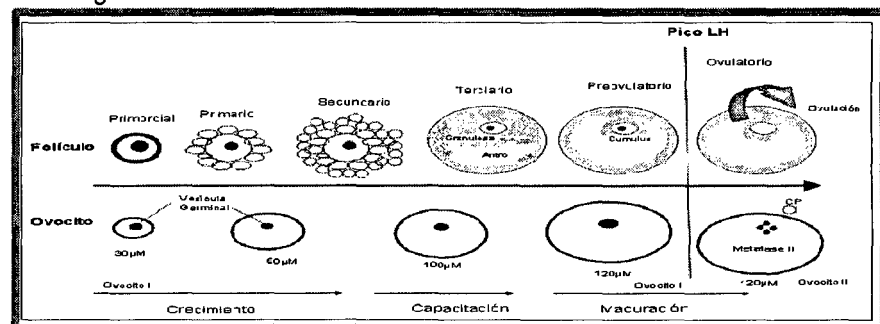
Conforme aumenta el antro, las células de la granulosa siguen proliferando y forman un hilillo que atrae al ovocito hacia el centro y lo rodean formando el complejo cúmulos ovocito (COC) permaneciendo así hasta la ovulación (Scott 1994, Shamsuddin y col. 1993 y Griffin y Ojeda, 1992). Este período de arresto, se cree que es mantenido por un factor inhibidor producido por las células foliculares.

Los ovocitos permanecen en este arresto, 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 y col. 1993).

C. Maduración del ovocito

Durante la maduración del ovocito, se producen una compleja serie de modificaciones en el citoplasma, junto con la maduración meiótica del núcleo 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 y col. 1993) y Dale y Elder, (1997).

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



Fuente: Mermillod y col. (1999).

C.1. Maduración nuclear

Durante el proceso de maduración, la cromatina contenida en el núcleo del ovocito inmaduro o vesícula germinativa está dispersa, y usualmente se encuentra acompañada de un nucléolo (Gordon, 1994). El colapso de la vesícula germinal involucra la condensación de la cromatina en pares, con pérdida de nucléolos y membrana nuclear, ocurriendo la diacinesis 16 horas después de haber iniciado el cultivo de ovocitos porcinos, de 5 a 6 horas en bovinos y de 3 horas en conejas (Thibault, 1977).

Sato y col.(1982) observaron la metafase I en ovocitos de cerdo entre 20 y 24 horas y 12 horas en bovinos después de haber iniciado el cultivo *in vitro*, completándose la maduración nuclear cuando se alcanza la metafase II y la expulsión del primer cuerpo polar se lleva a cabo. En general, el 80% de los ovocitos alcanzan la maduración 24 horas después de iniciar el cultivo *in vitro* (Gordon, 1994).

Los cambios que ocurren dentro del citoplasma y en la Zona Pelúcida (ZP), concurrentemente con cambios nucleares, son necesarios para continuar con el desarrollo. La maduración del núcleo es un proceso que aún no está bien entendido en ratas, ovejas, conejas, cerdas, ratonas y vacas (Noayes, 1952 citado por Brackett, 1985).

Las fases finales de la ovogénesis, ocurren antes de la ovulación y consisten en la pérdida de la membrana nuclear, desaparición de los nucléolos, condensación de los cromosomas, formación del huso de la primera división meiótica y expulsión del primer cuerpo polar,

ocurriendo todo esto bajo la influencia de las gonadotropinas hipofisarias y dentro de la protección de la corona radiada (Hardy y col. 1991). Brackett (1985) afirma que la habilidad para que los ovocitos reanuden la meiosis depende significativamente del estado de desarrollo folicular, siendo los ovocitos provenientes de los folículos preovulatorios los más competentes para completar la maduración nuclear en cultivo.

La maduración meiótica del ovocito conlleva la capacidad para la rotura de la membrana nuclear, y posterior progresión del ovocito de la fase G2 del ciclo celular de estadio de diploteno de la profase de la primera división meiótica hasta MII.

Durante la fase de Vesícula Germinal 0 (VG 0), la cromatina dispersa, característica de los ovocitos en la fase luteal. Según los estudios realizados por Motlik y Fulka (1986), los intervalos que suceden desde la liberación de LH hasta la rotura de la vesícula germinal, tienen una duración aproximada de 20 a 24 horas y pueden dividirse en cuatro fases bien diferenciadas; Inicia una parcial condensación con agregados de cromatina irregulares alrededor del núcleo frente a la membrana nuclear denominado vesícula germinal 1 (VG 1) Sobre las 8 a 10 horas posteriores a la exposición de LH, unos pocos agregados de cromatina se forman alrededor de la membrana nuclear (VG 2), y a las 16 horas la mayoría de los ovocitos exhiben puntos de cromatina condensada y el comienzo de la formación de hebras (VG 3). En la fase final, a las 20-24 horas después de LH, el nucléolo desaparece, la

cromatina se condensa formando una red de bivalentes individuales y se produce la rotura de la vesícula germinal (GVBD).

C.2. Cambios en los cúmulos oophorta

La masa de los cúmulos está compuesta de una parte celular y otra acelular. Esta última contiene proteínas, carbohidratos y ácido hialurónico. La expansión de las células circundantes del folículo preovulatorio es la principal diferencia entre un ovocito preovulatorio y uno no ovulatorio, siendo las células apretadas e invertidas características del primer estadio y las expandidas del segundo (Goto y col., 1990), las células compactas, inactivadas, apretadas y adheridas a la ZP responden a las gonadotropinas y esferoides foliculares, llamándosele a este proceso activación o Dulcificación.

C.3. 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 (Zamboni, 1972 citado por Brackett, 1985), aportando principalmente piruvato y oxalacetato. El rompimiento prematuro de esta capa resulta en la muerte del ovocito, ocurriendo esto en los destinados a la atresia.

C.4. Maduración Citoplasmática

La inducción de la maduración citoplasmática requiere de esteroides, síntesis de proteínas intrafoliculares y posiblemente de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), como mediador de la acción de las gonadotropinas. Esto ocurre de 6 a 8 horas, después de haber iniciado la actividad biosintética (Lambert y col., 1986). Gordon y Lu (1990) afirman que la maduración citoplasmática, involucra la migración de los gránulos corticales de su sitio de formación en el aparato de Golgi, hacia la periferia del citoplasma.

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 (Bolsy col. 1996; Pieterse y col., 1988 y Carolan y col., 1994).

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 y col. 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*

Los ovocitos son seleccionados bajo una lupa estereoscópica con aumento de 40x en base a sus características morfológicas, Leibfried y First, (1979) han sugerido un sistema de clasificación en escala, para clasificar los ovocitos según su calidad, de categoría 1 se considera los complejo cúmulos-ovocito (COCs) con cúmulos de capas múltiples, compacto, claro y transparente y citoplasma con granulación fina y homogéneas; categoría 2 son los del COCs, algo más oscuros y menos transparentes que los de la categoría 1, con citoplasma de granulación más gruesa y más oscura que los de la categoría 1, los de la categoría 3 poseen cúmulos menos compactos y más oscuro que los de la categoría 1 o 2 y su citoplasma tiene manchas oscuras; la categoría 4 incluye a los ovocitos con cúmulos expandido parcialmente desnudos o totalmente desnudos.

Leibfried y First (1979) en sus investigaciones, encontraron que la habilidad de los ovocitos para alcanzar la maduración *in vitro* no depende ni del tamaño del folículo ni del estadio del ciclo estral, siendo determinante sin embargo, la presencia de un citoplasma intacto. Por otro lado, Sacha D. y Rojas R. (2009), recomiendan trabajar 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.

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 partenogénéticos, 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 y col. 1992, 1994; Sansinema y col. 2003; Chaves y col. 2003; Miragaya y col. 2002; Ratto y col. 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

foliculos antrales de 2-6 mm de diámetro. Estos foliculos 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 y col., 2007). Si embargo existen pocos reportes de FIV en camélidos sudamericanos: Del Campo y col. (1994), Del Campo y col.(1995), Gómez y col.(2002), Conde y col.(2006), Ratto y col. (2007), Conde y col.(2008) y Gamarra y col.(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 1×10^6 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 a monta directa.

2.2.3. 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: Swim-up y gradiente de percoll (Del Campo y col., 1994; Del Campo y col., 1995; Gómez y col., 2002; Conde y col., 2006; Ratto y col., 2007; Conde y col., 2008; Gamarra y col., 2008; Mendoza y col., 2008; Machicado y col., 2009; Berland y col., 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 y col., 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 200 g durante 25 min. 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 y col. (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.

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 y col., 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 $50 \mu\text{l}$, que contienen entre 5 y 10 ovocitos (Del Campo y col. 1994; Del Campo y col. 1995; Gómez y col. 2002; Conde y col. 2006; Ratto y col. 2007; Conde y col. 2008; Gamarra y col. 2008; Mendoza y col. 2008; Machicado y col. 2009; Berland y col. 2010).

Cox y col. (1993) y Zhang y col. (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.

2.2.4. 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.

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, 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).

C. Requerimientos ambientales y nutritivos para el cultivo *in vitro* de embriones

Aunque la maduración y la fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos, puede llevarse a cabo en una gran variedad de condiciones de cultivo; hay grandes diferencias en la calidad de los mismos, especialmente en el número de células y viabilidad en general. Por lo tanto, para desarrollar un sistema de cultivo de embriones que produzca resultados aceptables, se deben tomar en cuenta dos enfoques:

- 1) La determinación de las necesidades bioquímicas del embrión y su desarrollo.
- 2) La consideración del medio ambiente en el cual los embriones se encuentran *in vivo*, ambos de igual importancia, por lo que es necesario considerarlos juntos (Thompson, 1996).

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCION DEL PROYECTO

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 llama fueron recuperados en el Camal Municipal de Huancavelica y trasladados al laboratorio.

3.2. MATERIALES Y EQUIPOS

A. MATERIAL BIOLÓGICO

- Ovarios de llama
- Testículos de llama

B. MATERIALES DE LABORATORIO

- Micropipetas
- Puntillas para micropipeta de 0,5 - 10 µl

- Puntillas para micropipeta de 20 – 100 μ l
- Puntillas para micropipeta de 100 – 1000 μ l
- Placa petri 35 x 10 mm
- Placa petri 90 x 15 mm
- Tubo Falcon graduado de 15ml
- Tubo Falcon graduado de 50ml
- Vasos precipitados de 50ml
- Láminas portaobjetos y cubreobjetos
- Pissetas de 500ml
- Rollos de papel toalla
- Pliegues de filtro de 25mm p/jeringa 0.2 μ m.
- Guantes quirúrgicos

C. REACTIVOS E INSUMOS QUÍMICOS

Medio de maduración (IVM)

- Medio de cultivo de tejido TCM-199 polvo(M 5017)
- Bicarbonato de sodio NaHCO_3
- HEPES
- Agua químicamente pura (Agua mili Q)
- Suero bovino fetal (SFB)
- Hormona folículo estimulante (FSH)
- Piruvato de sodio (Py)
- Gentamicina stock
- Estradiol 17- β

- Aceite mineral

Medio de fecundación (FERT-TALP)

- Cloruro de sodio (NaCl)
- Cloruro de potasio (KCl)
- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
- Lactato de sodio
- Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Cloruro de magnesio heptahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- Rojo fenol (0.5%)
- Piruvato de sodio
- Gentamicina
- BSA faty free (A-6003)
- Heparina

SOF HEPES (Fluido de oviducto sintético)

- Stock A
- Stock B
- Piruvato de sodio (PyNa)
- L-glutamina
- Glucosa
- Glicina
- Taurina
- Lactato de sodio (60%)
- Aminoácidos esenciales (BME)

- Aminoácidos no esenciales (MEM)
- Insulina
- Sulfato de gentamicina
- Agua mili Q.

Estudio Citogenético

- Cloruro de potasio (KCl)
- Solución éter: alcohol (1:1)
- Fijador carnoy(metanol: ácido acético, 3:1)
- Colorante giemsa(4%)

D. EQUIPOS DE LABORATORIO

- Incubadora de CO₂
- Cámara modular con mezcla de gases
- Cámara de flujo laminar
- Microscopio óptico
- Estereoscopio
- Estufa
- Balanza analítica
- Potenciómetro
- Baño María

E. EQUIPOS DE GABINETE

- Cámara fotográfica digital
- Computadora
- Impresora

3.3. METODOLOGIA

Previo al trabajo de colección y manipulación de los ovarios se esterilizo todos los materiales a trabajar.

A) OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRA

Se recuperó ovarios de llama en el Camal Municipal de Huancavelica, y llevados en termos a temperatura ambiente al Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Universidad Nacional de Huancavelica, dentro de las tres horas siguientes al sacrificio de los animales (Sacha D. y Rojas R. 2009; Huaman E. y Ticlliacuri F. 2011; Santayana P. 2012).

B) RECUPERACIÓN DE OVOCITOS

Se obtuvieron los Complejos Cúmulo Ovocitos (COCs) de acuerdo al protocolo descrito por Ratto y col. (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 un tubo graduado de 50cc (Falcón) que reposó en baño maría a 37°C por 20 minutos. Luego el sedimento se aspiró con una pipeta pasteur y depositado sobre placas petri, se lavaron en 4 gotas de medio IVM de 50 µl cada uno.

La selección de los COCs se realizó de acuerdo a Sacha y Rojas. (2009) con la ayuda de una micropipeta, bajo una lupa estereoscópica. La selección de los COCs fue en base a una evaluación morfológica donde se seleccionaron ovocitos de cúmulus compacto de no menos de 3 capas y con un citoplasma de granulación fina y uniforme, se descartaron inmediatamente aquellos ovocitos demasiado pequeños, con cúmulus muy oscuros, así también aquellos que tengan

un citoplasma irregular con áreas muy claras o muy oscuras. Todos los procedimientos se realizaron en la cámara de flujo laminar.

C) MADURACIÓN DE OVOCITOS SELECCIONADOS

La maduración de los ovocitos se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Ratto y col. (2005) con algunas modificaciones introducidas por Ruiz y col. (2010). Se maduraron ovocitos *in vitro* por 28, 36 y 42 horas en gotas de 50 μ l (8-12 COCs/gota) en una cámara modular con atmósfera húmeda de 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂ a 38.5 °C, usando un medio de cultivo de tejido (TCM-199) suplementado con 25 mM de Hepes, pirubato 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% (v/v), cubiertas con aceite mineral en placas de cultivo de 35 x 10 mm.

D) EVALUACIÓN DEL ESTADO NUCLEAR DE LOS OVOCITOS

Para visualizar las estructuras cromosómicas se utilizó una metodología de fijación y tinción basada en la técnica descrita por Chang (1951), con algunas modificaciones.

En primer lugar, se procedió a limpiar y desengrasar los portaobjetos utilizando una mezcla de etanol (96%) y éter etílico (1:1).

Transcurrido el tiempo de maduración, los ovocitos seleccionados para la fijación y tinción se extrajeron del medio de cultivo y se introdujeron en una solución de hialuronidasa 1 mg/ml por 2 minutos, pasado este tiempo se aspiraron repetidamente con una micropipeta en 20 μ l con el objeto de remover completamente las células del cúmulo adheridas a la zona pelúcida, para luego ser lavados en PBS al 1%.

El siguiente paso fue colocar el total de ovocitos a fijar en una placa de cultivo de 35 x 10 mm que contenía el fijador Carnoy a 4°C (metanol absoluto:ácido acético glacial, 3:1) y sellado anulando el contacto con el medio ambiente durante 24 horas para su fijación.

Después de este periodo de tiempo, se extrajeron los ovocitos de la solución de fijación para ser lavados en una gota de PBS al 1% e inmediatamente se colocaron al portaobjeto limpio y desengrasado. Luego de esto, se cogió el colorante (orceína acética al 1%) con una micropipeta de 100 µl, y se dejó caer la gota directamente sobre los ovocitos; el exceso de colorante se eliminó y se dejó reposar por 4 a 5 minutos, pasado este tiempo se procedió a decolorar las muestras utilizando una solución de; glicerol: ácido acético: agua destilada (1:1:3).

Todo este procedimiento se realizó observando en una lupa estereoscopia a 30x.

La morfología nuclear de los ovocitos teñidos se examinó bajo un microscopio óptico, con objetivo de 40X, para luego ser clasificados en 4 categorías en función a su estadio nuclear: vesícula germinal (VG), vesícula germinal rota (GVBD), metafase I (M-I) y metafase II (MII).

Los ovocitos se clasificaron en 4 categorías en función del estado nuclear:

- VG: Se observó la presencia del núcleo rodeado por una membrana nuclear y cromatina laxa. Los oocitos no han reiniciado la meiosis.
- VGBD (rotura de vesícula germinal): Desaparece la membrana nuclear. Se ha reanudado la meiosis.
- M I (Metafase I): Cromosomas bivalentes condensados al máximo en el ecuador del huso acromático.

- M II (Metafase II): Cromosomas condensados en metafase y extrusión del primer corpúsculo polar.

Se consideró un ovocito maduro nuclearmente cuando alcanzó el estadio de metafase II.

E) RECUPERACIÓN Y CAPACITACION DE LOS ESPERMATOZOIDES

Se obtuvo espermatozoides a partir de testículos de llama macho (superiores a 3 cm de diámetro) sacrificados en el Camal Municipal de Huancavelica y transportados al laboratorio en termos a una temperatura ambiente (15-18°C).

La recuperación de espermatozoides se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Ratto y col. (2005) con algunas modificaciones, se separó los conductos deferentes y el epidídimo del testículo, previo lavado de estos con suero fisiológico (SSF) 0.9% atemperados a 37°C, posteriormente se depositó en una placa petri y adicionando 2 ml de medio Sperm-TALP suplementado con 2 mg/ml de BSA, piruvato de sodio al 1 mM y sulfato de gentamicina 50 µg/ml, se procedió a realizar cortes transversales del epidídimo y hacer el ordeñado de estos.

Los espermatozoides recuperados se lavaron y seleccionaron mediante la técnica de swim-up: se colectó y depositó 1 ml del ordeñado del epidídimo en un eppendorf y se llevó a centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos, obteniendo un pellet en el fondo del eppendorf. Se retiró el sobrenadante dejando una mínima cantidad, para posteriormente llevar al vortex y disolver el pellet. El homogenizado se colectó con una micropipeta de 100 µl y se depositó en el fondo de un eppendorf que contenía 1 ml de medio Fert-TALP, luego se llevó a la incubadora a 37°C durante 30 minutos a 90% de humedad y 5% de CO₂, con una inclinación de 45°. Pasado los 30 minutos, se colectó el sobrenadante y se depositó en otro

eppendorf para ser centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante dejando una mínima cantidad y se homogenizó, el eppendorf se llevó a la incubadora por unos 10 minutos hasta su utilización.

F) PREPARACION DE LOS OVOCITOS

Después del tiempo de maduración *in vitro* (28, 36 y 42 horas), se soltó ligeramente las células del cúmulo mediante agitación mecánica con una micropipeta de 25 µl. Los ovocitos se lavaron en cuatro gotas de medio Fert-TALP, para luego ser depositadas en gotas de fecundación hasta el momento de la inseminación.

El medio de fecundación se dispuso en microgotas de 50 µl. de medio Fert-TALP, en placas petriestériles de 35x10 mm. Las microgotas se cubrieron totalmente con aceite mineral y se equilibraron en la incubadora de CO₂ a 38.5 °C por espacio de 2 horas antes de iniciar la fecundación *in vitro*. En cada microgota se colocaron de 5 a 6 ovocitos.

G) FECUNDACIÓN DE OVOCITOS

La fecundación *in vitro* se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Ratto y col. (2005). A cada gota de fecundación se añadió 5 µl de suspensión de espermatozoides capacitados, con una concentración final aproximada de 1.5-2x10⁶ espermatozoides/ml. (Santayana, 2012), los ovocitos y espermatozoides se mantuvieron juntos, en la incubadora durante 18 h a 38.5°C, 90% de humedad y 5% de CO₂.

El co-cultivo se mantuvo durante el tiempo establecido (28, 36 y 42 horas) a 37.5°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y saturada humedad, evaluándose el desarrollo embrionario.

H) CULTIVO *in vitro* DE EMBRIONES

Luego de la inseminación, los ovocitos se cultivarán de acuerdo al protocolo descrito por Martínez y col. (2007), por 7 días en gotas de 40 µl. de medio fluido oviductal sintético (SOF-IVC) suplementado con 3 mg/ml de BSA en una cámara modular de cultivo a 38.5 °C en atmósfera húmeda con 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂ al aire.

3.4. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCION DE DATOS

A. EVALUACION DE LOS ESTADIOS NUCLEAR DE LOS OVOCITOS

Luego de la fijación y tinción de los ovocitos se evaluó las siguientes configuraciones meióticas, según los criterios de Villamediana (1998).

➤ Ovocitos inmaduros:

- Vesícula germinal (VG): El núcleo del ovocito está intacto. La membrana nuclear es visible y la cromatina está solamente dispuesta alrededor del nucléolo, que habitualmente también está presente. En el resto del núcleo hay pocas zonas que se tiñen con orceína aunque, a veces, la cromatina se distribuye en grumos que sí se tiñen.
- Vesícula Germinal Rota (GVBD, "germinal vesicle break down") desaparecen la membrana nuclear y el nucléolo, lo que constituye la degradación y desaparición de la vesícula germinal (GVBD). A veces, se observa la membrana nuclear de forma difusa, y los cromosomas bivalentes comienzan a contraerse e individualizarse.
- Metafase I (M-I): Los cromosomas se encuentran condensados e individualizados al máximo, generalmente agrupados en masa y aglutinados en la zona ecuatorial del ovocito.

- Ovocitos maduros:
 - Metafase II (M-II): En este estadio los cromosomas están contraídos y situados en el ecuador del segundo huso acromático. Además, también se visualizan los cromosomas correspondientes al primer corpúsculo polar. Telofase I (T-I): La posición de los cromosomas es terminal, en ambos polos del huso acromático. A veces se puede observar la membrana del primer corpúsculo polar, aunque el huso acromático esté todavía presente.
- Ovocitos con el material nuclear degenerado
 - Degenerados (DEG): Todas aquellas estructuras nucleares (que se tiñen con la orceína) que se encuentran dispersas e incompletas; o grandes zonas vacuolizadas y fragmentadas en el citoplasma del ovocito.

B. EVALUACION DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

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

- Segmentado (48 horas): De 2 a 16 células.
- Mórula (día 5-6): Aproximadamente entre 16 y 64 células. El cigoto cuando 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, cuando presenta de 32 y 64 células, estos están unidos y constituyen una masa compacta que ocupa sólo el 60 a 70% del espacio perivitelino.
- Blastocisto (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.

3.5. ANALISIS ESTADISTICO

Los experimentos en maduración nuclear fueron repetidos 7 veces para cada tiempo (28, 36, 42 horas), y desarrollo embrionario 3 veces para 36 y 42 horas. Las diferencias estadísticas de los experimentos (maduración nuclear de ovocitos y desarrollo embrionario) fueron comparadas con un Diseño Completamente al Azar (DCA).

El modelo estadístico que se utilizó para describir una observación fue:

- Y_{ij} = observaciones (% VG, GVBD, MI y MII; Segmentación, mórula y blastocisto)
- μ = media general
- T_i = efecto de los tratamientos ($T_1=28h$, $T_2=36h$ y $T_3=42h$)
- e_{ij} = error asociado a cada observación.

Los datos obtenidos de la maduración nuclear y del desarrollo embrionario son expresados en porcentajes y transformados a arcoseno para el análisis de varianza (ANOVA) de acuerdo a Herrera J. y Carse L. (2000), que menciona que el arcoseno se usa cuando los datos tienen una distribución bimodal y no son homogéneos, deben estar expresados en fracciones decimales o porcentajes (los valores de los datos deben comprender entre 0 y 1 antes de transformarlos). Cuya fórmula es:

$$X' = 2 \arcsen \sqrt{P}; P = \%$$

Se utilizó la prueba de Duncan para contrastar la diferencia entre promedios ($p < 0.05$).

Los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico spss v. 15.0 para Windows.

CAPITULO IV
RESULTADOS

Cuadro N° 1. Efecto del tiempo de maduración *in vitro* en porcentaje (media $\pm$ S.E.M: error estándar de la media) de maduración nuclear de ovocitos de llama.

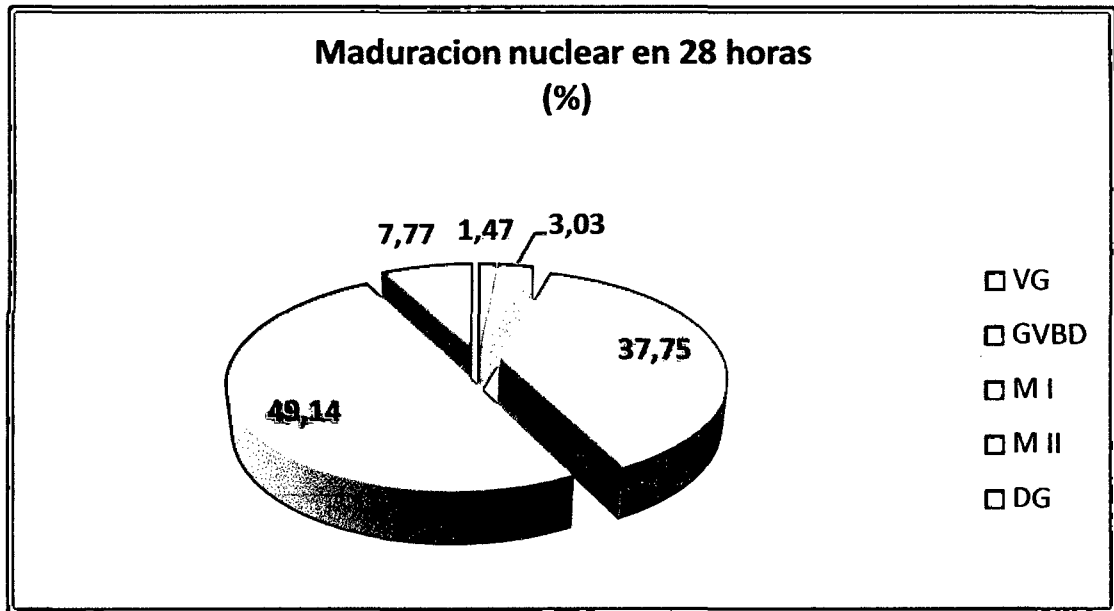
Tiempo de maduración <i>in vitro</i> (horas)	N° Total de ovocitos (Replicas)	Estadios de maduración nuclear				
		N° de ovocitos inmaduros (media $\pm$ S.E.M.)			N° de ovocitos maduros (media $\pm$ S.E.M.)	
		VG	VGBD	M-I	M-II	N° Ovocitos degenerados (media $\pm$ S.E.M.)
28	223 (7)	4 (1.46 $\pm$ 0.52) ^a	7 (3.03 $\pm$ 0.84) ^a	84 (37.75 $\pm$ 1.00) ^a	112 (49.14 $\pm$ 2.79) ^b	16 (7.77 $\pm$ 1.54) ^a
36	222 (7)	5 (1.83 $\pm$ 0.73) ^a	3 (1.67 $\pm$ 1.10) ^a	41 (18.88 $\pm$ 1.11) ^b	159 (70.17 $\pm$ 4.21) ^a	14 (7.02 $\pm$ 2.23) ^a
42	227 (7)	5 (1.83 $\pm$ 0.73) ^a	6 (2.42 $\pm$ 1.09) ^a	41 (18.55 $\pm$ 2.97) ^b	160 (70.53 $\pm$ 3.72) ^a	15 (6.55 $\pm$ 0.67) ^a

Fuente: Elaboración propia.

VG: Vesícula germinal; VGBD: Vesícula germinal rota; M-I: Metafase I; M-II: Metafase II.

^{a,b}: letras diferentes en la misma columna denotan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

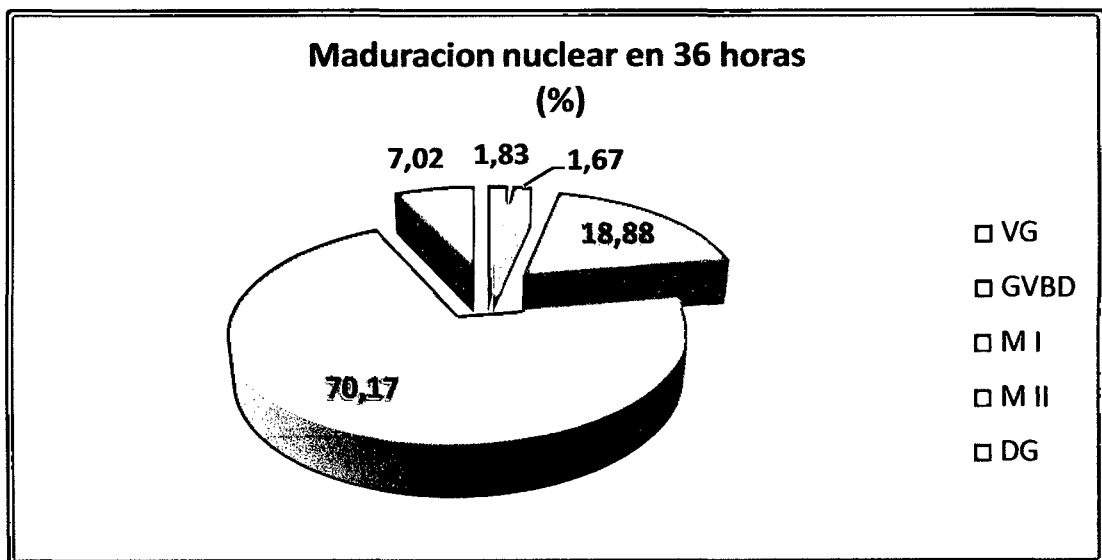
Grafico N°1: Porcentaje de maduración nuclear para 28 horas en llamas.



Fuente: Elaboración propia

INTERPRETACION: En la maduración nuclear de 28 horas, presenta mayor porcentaje de metafase II (49.14%), seguido de metafase I (37.75%), degenerados (7.77%), vesícula germinal rota (3.03%) y vesícula germinal (1.47%).

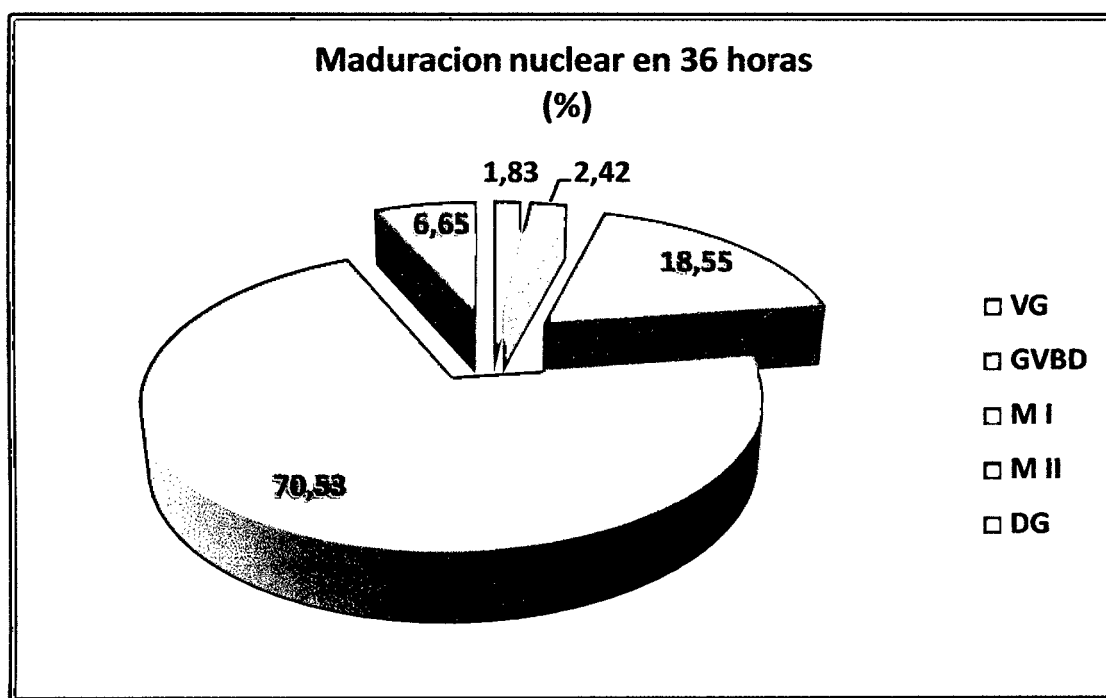
Grafico N°2: Porcentaje de maduración nuclear para 36 horas en llamas.



Fuente: Elaboración propia

INTERPRETACION: Para la maduración nuclear de 36 horas, tenemos mayor porcentaje de metafase II (70.17%), seguido de metafase I (18.88%), degenerados (7.02%), vesícula germinal (1.83%) y vesícula germinal rota (1.67%).

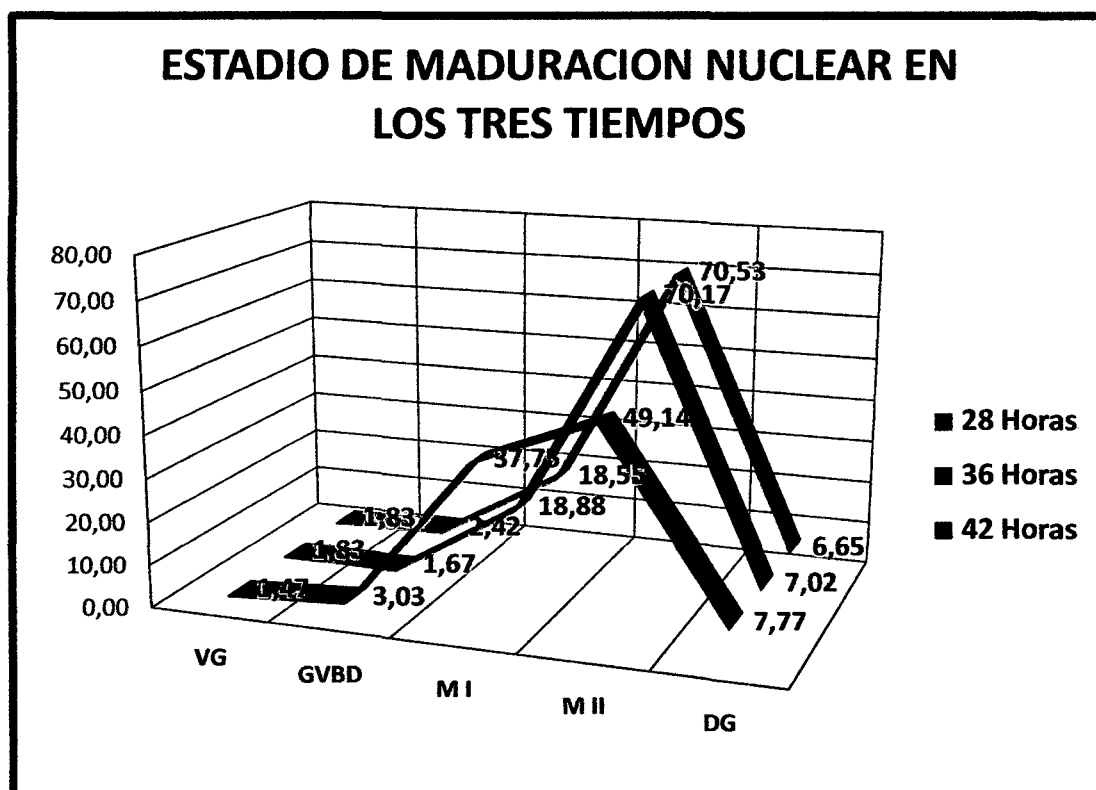
Grafico N°3: Porcentaje de maduración nuclear para 42 horas en llamas.



Fuente: Elaboración propia.

INTERPRETACION: En cuanto a la maduración nuclear de 42 horas, tenemos mayor porcentaje de metafase II (70.53%), seguido de metafase I (18.55%), degenerados (6.65%), vesícula germinal rota (2.42%) y vesícula germinal (1.83%).

Grafico N°4: Comparación de los tratamientos (tiempos de maduración) en porcentajes del estadio de maduración nuclear.



Fuente: Elaboración propia.

INTERPRETACION: Se puede apreciar que en los diferentes estadios de maduración nuclear como vesícula germinal (VG), vesícula germinal rota (GVBD) y en los ovocitos degenerados (DG) se puede notar que no hay diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre los tiempos de 28, 36 y 42 horas lo cual se demuestra mediante el ANOVA, y en los estadios de maduración de metafase I (MI) y metafase II (M II) se distingue diferencias en el grafico 5, para los tiempos en estudio lo cual se corrobora con el ANOVA mostrando diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

Cuadro N° 2: Efecto del tiempo de maduración *in vitro* de ovocitos de llama (*Lama glama*) en el porcentaje (media $\pm$ S.E.M: error estándar de la media) de desarrollo embrionario luego de la fecundación *in vitro*.

Tiempo de maduración <i>in vitro</i> (horas)	N° Total de ovocitos inseminados (Replicas)	Estadios de desarrollo embrionario (media $\pm$ S.E.M.)		
		Segmentación (48 horas)	Mórula (4 días)	Blastocisto (7 días)
36	66 (3)	34/66 (51.00 $\pm$ 3.31) ^a	24/34 (71.47 $\pm$ 2.49) ^a	4/34 (11.64 $\pm$ 1.30) ^a
42	80 (3)	40/80 (49.55 $\pm$ 3.56) ^a	31/40 (76.69 $\pm$ 2.90) ^a	5/40 (12.51 $\pm$ 2.22) ^a

Fuente: Elaboración propia.

^{a,b}: letras diferentes en la misma columna denotan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$)

DISCUSION

La maduración nuclear de ovocitos *in vitro* en camélidos sudamericanos es de interés en la mejora de esta especie. Ratto y col. (2005) obtuvo 77,7%, 80,6% y 80,4% de COCs de llama maduros (metafase II) cuando utilizaron 28, 30 y 36 horas sin diferencias estadísticas entre los 3 tiempos evaluados, concluyendo que se puede madurar ovocitos de llama con 28 horas. Sin embargo Huamán y Ticlliacuri (2011) compararon dos atmosferas de cultivo de embriones (5% de CO₂ y una mezcla de 90% N₂, 5% CO₂ y 5% O₂), y los COCs de alpacas fueron madurados durante 25 horas evaluando porcentajes de división, mórula y blastocisto; 86,36%; 78,26%, 10,04% y 91,28%; 86,11%, 11,22% respectivamente por cada experimento sin encontrar diferencias estadísticas, por otro lado Huanca y col. (2009), recomiendan 38 horas o más para MIV de COCs de alpaca, debido a que encontraron 18,9%, 42,9% y 65,8% de COCs en M II para 30, 34 y 38 horas de maduración respectivamente y tasas de segmentación de 9,5%, 7,7% y 15,4% para 30, 34 y 38 horas de maduración respectivamente, sin reportar el logro de blastocistos. Por otro lado Santayana (2012), encontró que el mayor porcentaje de maduración nuclear (ovocitos de alpaca en MII) fue alcanzado a las 32 h de cultivo *in vitro* con un 65.08% seguido por el de 28 horas con 50.33% y finalmente el de 24 horas con un 46.33%, en cuanto al

desarrollo embrionario, observó que los porcentajes de segmentación y blastocistos aumentaron gradualmente hacia el mayor tiempo de maduración, siendo el de 32 horas el tiempo con el mayor índice de desarrollo alcanzado, con un 60.17% y 17.02% en comparación con 47.54% y 14.19% para 28 horas y 41.55% y 11.03% para 24 horas, para los estadios de segmentación y blastocisto respectivamente.

Sin embargo en la presente investigación se obtuvo mayor porcentaje de maduración nuclear (metafase II) para 36 y 42 horas con $70.17 \pm 4.21\%$ y $70.53 \pm 3.72\%$ respectivamente seguido de 28 horas con $49.14 \pm 2.79\%$, este resultado contradice lo concluido por Ratto y col (2005). En cuanto al desarrollo embrionario se obtuvo el porcentaje de segmentación, mórula y blastocisto son $51.00 \pm 3.31\%$, $71.47 \pm 2.49\%$ y $11.64 \pm 1.30\%$ respectivamente para 36 horas y el porcentaje de segmentación, mórula y blastocisto son $49.55 \pm 3.56\%$, $76.69 \pm 2.90\%$ y $12.51 \pm 2.22\%$. respectivamente para 42 horas, sin encontrarse diferencias estadísticas entre los tratamientos.

CONCLUSION

De la presente investigación se concluye que:

El tiempo óptimo que requiere los ovocitos de llama para llegar a la madurez nuclear (metafase II) está entre 36 y 42 horas

El tiempo óptimo de maduración para un mejor desarrollo embriones de llama producidos por fecundación *in vitro* está entre 36 y 42 horas.

El tiempo óptimo para la maduración nuclear y la adquisición máxima de la capacidad de desarrollo embrionario *in vitro*, de ovocitos de llama, es de 36 y 42 horas, bajo las condiciones del presente estudio.



RECOMENDACIONES

De acuerdo al resultado obtenido en la presente investigación se recomienda madurar *in vitro* deCOCs de llama entre los tiempos de 36 y 42 horas.

Se requiere mayor estudio de maduración nuclear para establecer protocolos entre los tiempos de 36 y 42 horas.

Para mejorar los porcentajes de segmentación, mórula y blastocisto se recomienda realizar mayor estudio en los tiempos de 36 y 42 horas.

Se debe continuar con estos trabajos de investigación, con el objetivo de permitir la estandarización de parámetros para el avance y aplicación de biotecnologías reproductivas en Camélidos Sudamericanos.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- ❖ **Apaza N., Olarte U. y Málaga J. 1998.** Empadre controlado de alpacas Huacaya en el Banco de Germoplasma de la E.E. ILLPA Puno. Memorias de la XXI Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Universidad Nacional del Altiplano. Puno-Perú.
- ❖ **Apaza N., Sapana R., Huanca T. y Huanca W. 2001.** Inseminación Artificial en alpacas con semen fresco en comunidades campesinas. Memorias de la XIV Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.
- ❖ **Atabay E., Takahashi Y., Katagiri S., Nagano M., Koga A. and Kanai Y. 2004.** Vitrification of bovine oocytes and its application to intergeneric somatic cell nucleus transfer. *Theriogenology* 61: 15-23.
- ❖ **Bearden J. and Fuquay W. 1997.** Applied Animal Reproduction. 4th. Edition. A Simon & Schuster Company. Upper Saddle River, NJ. p. 351.
- ❖ **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.
- ❖ **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.
- ❖ **Brackett B. 1985.** *In vitro* oocytes maturation and fertilization. *J. Anim. Sei* 61:14.

- ❖ **Brackett B. 1988.** Aplicaciones de la fertilización *in vitro*. Avances en Zootecnia. Ed. Acribía. Zaragoza, España, p. 159.
- ❖ **Cárdenas O., Huanca T., Sapana R. y Alarcón V. 1999.** Avances de inseminación artificial de llamas con semen congelado. XXII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Huancavelica – Perú. 14 - 17 setiembre.
- ❖ **Carolan, C.; Lonergan, P.; van Langendonck, A. and Mermillod P. 1994.** Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. Theriogenology. Vol. 43, pp. 1115-1128.
- ❖ **Chang, M.C 1951.** Fertilizing capacity of spermatozoa into the fallopian tubes. Nature 168: 697.
- ❖ **Chaves M., Miragaya M., Capdevielle E., Rutter B., Giuliano S. y 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. 2-4 de Mayo
- ❖ **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
- ❖ **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.

- ❖ **Conde PA, C Herrera, VL Trasorras, S Giuliano, A Director, MH Miragaya, MG Chaves, MI Carchi, D Stivale, C Quintans C, A Agüero, B Rutter, S Pasqualini. 2007.** *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Animal Reproduction Science*. Article in press. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.10.004.
- ❖ **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.
- ❖ **Consejo Nacional de Camélidos Sudamericanos (CONACS). 2004.** Situación actual de los camélidos sudamericanos – Perú.
- ❖ **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.
- ❖ **Cupps P. 1987.** Reproduction in Domestic Animals. 4th. Edition. Academic Press, Inc. San Diego Calif 679 p.
- ❖ **Dale B. and Elder K. 1997.** *In vitro* fertilization. Cambridge University Press, p. 18.
- ❖ **Del Campo M., Donoso M. and Del Campo C. 1992.** *In vitro* maturation of Llama (*Lama glama*) oocytes. Proc 12th Int Cong AnimReprod, 1992; vol 1, p 324.
- ❖ **Del Campo M., Del Campo C., Donoso M., Berland M., Maplettoft R. 1994.** *In vitro* fertilization and development of Llama glama oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology* 41: 1219-1229.

- ❖ **Del Campo MR, C.H Del Campo, GP Adams and RJ Maplettoft. 1995.** The application of new reproductive technologies to South American Camelids. *Theriogenology* 43: 21-30.
- ❖ **Dinnyes A., Dai Y., Jiang S. and Yang X. 2000.** High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 63: 513-518.
- ❖ **Dobrinsky J. 1996.** Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 45 (1):17-26.
- ❖ **Dobrinsky J. 2002.** Advancements in criopreservation of domestical animal embryos. *Theriogenology*, 57 (1): 285-302.
- ❖ **First, N.L. y J.J. Parrish 1987.** - *In vitro* fertilization in ruminants. *J. Reprod. Fert.* (Suppl. 34): 151- 165.
- ❖ **Flint A. 1981.** An unifying hypothesis for the control of blastocyst growth based on observations on the pig. *J. Reprod. Fert.*; 29:215-227.
- ❖ **Francois J., Michael A. and Marc-YréSirard. 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.
- ❖ **Gamarra G,E Huamán,SLeón,MCarpio,EAlvarado,MAsparrin, W. Vivanco. 2008.** First *in vitro* embryo production in alpacas (*lama pacos*). *Reproduction, Fertility and Development* 21, 177-178.
- ❖ **Gómez C., Ratto M., Berland M., Wolter M. and Adams G. 2002.** Superstimulatory response and oocyte collection in Alpacas. *Theriogenology* 57:584 (abstract).

- ❖ **Gordon I. and Lu K. 1990.** Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology*. 33:77.
- ❖ **Gordon I. 1994.** Laboratory Production of Cattle Embryos. CAB International. University Press, Cambridge, p. 639.
- ❖ **Goto K., Konoshita A., Takuma Y. and Ogawa K. 1990.** Fertilization by sperm injection in cattle. *Theriogenology*. 33:238.
- ❖ **Griffin E. and Ojeda R. 1992.** Textbook of Endocrine Physiology. 2nd, Edition. Oxford University Press. New York, Oxford, pp. 351.
- ❖ **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.
- ❖ **Hardy R., Winston L. and Hyside A. 1991.** Nuclear abnormalities y development arrest in human preimplantation embryos in vivo. *Human Reproduction*. 7th. World Congress on *In Vitro* Fertilization y Assited Procreations. Paris-Francia. 6:152.
- ❖ **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
- ❖ **Huanca W., Condori R., Cainzos J., Chileno M., Quintela L., Becerra J. and Herradon P. 2009.** *In Vitro* Maturation And *In Vitro* Fertilization of Alpaca (*Vicugna Pacos*) Oocytes: Effect Of Time Of Incubation On Nuclear Maturation And Cleavage. *Reproduction, Fertility and Development* 22(1) 327–327.
- ❖ **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.

- ❖ **Hunter R. 1990.** Fertilization of pig eggs in vivo and in vitro. Journal of reproduction and fertility. Supplement 40: 211-226.
- ❖ **Kasai M. and Mukaida T. 2004.** Cyopreservation of animal and human embryos by vitrification. Reprod Biomed Online. 9 (2):4-170.
- ❖ **Lambert R., Sirard M., Bernard C., Bely R., Rioux J., Leclerc P., Menard D. and Beyoda M. 1986.** *In vitro* Fertilization of bovine oocytes matured *in vivo* and collected at laparoscopy. Theriogenology. 25:117.
- ❖ **Leibfried L. and First N. 1979.** Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. J. Anim. Sei 48:76.
- ❖ **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.
- ❖ **Martínez-Díaz M., Gatica R., Correa J. y Eyestone W. 2007.** Gestaciones producidas con embriones bovinos clonados por transferencia nuclear. Arch Med Vet 39: 59-62.
- ❖ **Massip A. 2003.** Cryopreservation of bovine oocytes: current status and recent developments. Reprod. Nutr. Dev. 43: 325-330.
- ❖ **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.

- ❖ **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.
- ❖ **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.
- ❖ **Motlik, J. y J. Fulka 1986.-** Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* 25: 87-96.
- ❖ **Palma G. 2001.** Producción *in vitro* de embriones. En Palma GA. Primera edición. *Biotechnología de la Reproducción*. Pp 225-282. INTA Balcarce.
- ❖ **Parrish, J.J., J.L. Susko – Parrish, M-L. Leibfried-Rutledge, E.S. Critser, W.H. Eyestone y N.L. First. – Bovine in vitro fertilization with frozen – thawed semen. Theriogenology 25:591 - 600, 1986.**
- ❖ **Pieterse M., Kappen K., Kruip A. and Taveræ M. 1988.** Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning on the ovaries. *Theriogenology*. 30:751.
- ❖ **Quispe E., Alfonso L., Flores A. y Guillén H. 2008.** Bases para establecer un programa de mejora de alpacas en la región alto andina de Huancavelica-Perú. En: Quispe E (ed). *Actualidades sobre adaptación, producción, reproducción y mejora genética en camélidos*. Págs. 93 - 112. 1a ed. Universidad Nacional de Huancavelica, Perú, Pp 93-112.
- ❖ **Ratto M., Wolter M., Gomez C., Berland M. and Adams G. 1999.** *In vitro* maturation of lama oocytes. Libro de resúmenes. *II Congreso Mundial sobre Camélidos*. Cuzco-Perú.

- ❖ **Ratto M., Singh J., Huanca W. and Adams G. 2003.** Ovarian follicular wave synchronization and pregnancy rate alter fixed-time natural mating in llamas. *Theriogenology*60, 1645 – 1656.
- ❖ **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.
- ❖ **Ratto M., Gómez C., Berland M. and Adams G. 2006.** Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Animal Reproduction Science*97: 246-256
- ❖ **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.
- ❖ **Ruiz J. y Correa J. 2007.** Maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca y llama aspirados vía laparoscópica. I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú. 20 - 22 de noviembre.
- ❖ **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.
- ❖ **Ruiz J., Correa J. y Martínez M. 2010.** Vitricación de ovocitos bovinos y su uso en el desarrollo partenogénico de embriones. *ArchMedVet*42: 79-83.
- ❖ **Sacha D, Rojas R. 2009.** Influencia de la categoría del ovocito en la producción de embriones partenogénéticos de alpaca (*Vicugna pacos*) en Huancavelica. Perú.

- ❖ **Saeki, K., M.L. Leibfried-Rutledge y N.L. Ffirst 1990.** Are fetal calf serum and hormones necessary during *in vitro* maturation of cattle oocytes for subsequent development. *Theriogenology* 33: 316.
- ❖ **Saha S., Rajamahendran R., Boediono A., Sumantri C. and Suzuki T. 1996.** Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 o 9 days of culture *in vitro* following vitrification and one-step dehydration. *Theriogenology*; 46, 331-343.
- ❖ **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.
- ❖ **Sansinema M., Taylos S., Taylor P., Schmidt E., Denniston R. and Godke R. 2007.** *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmatic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Animal Reproduction Science* 99: 342-353.
- ❖ **Santaló J. 1985.** Anomalies cromosomiques al moment de la concepció. Estudi comparatiu de les fecundacions *in vivo* e *in vitro*. Tesi Doctoral. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona.
- ❖ **Santayana P. 2012.** Tiempo de maduración de ovocitos de *Vicugna pacos* "alpaca" en el desarrollo embrionario por fecundación *in vitro*, Huancavelica 2011. Tesis de Biologo. UNSCH.
- ❖ **Sato E., Iritani A. and Nishikawa Y. 1982.** Analysis of the hours required for germinal vesicle breakdown in pig y cattle oocytes. *J. Fert. Steril* 27:112.
- ❖ **Scott F. 1994.** *Developmental Biology*. 4th. Edition. Sunderty, Massachusetts, p.894.

- ❖ **Shamsuddin M., Larsson B. and Rodríguez-Martínez H. 1993.** Maturation related changes in bovine oocytes under different culture conditions. *Anim. Reprod. ScL* 31:49.
- ❖ **Tarkovski A. 1966.** An air drying method for chromosome preparations from mouse eggs". *Cytogenetics*, 5: 394-400.
- ❖ **Thibault C. 1977.** Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes. *J. Reprod. and Fert.* 51:1.
- ❖ **Thompson G. 1996.** Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology*, 45:27.
- ❖ **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.
- ❖ **Villamediana, P. 1998.** Embriones caprinos producidos *in vitro*: estudio citogenético y ultraestructural de ovocitos madurados y fecundados *in vitro*. Universidad Autónoma de Barcelona. España. Tesis de grado.
- ❖ **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

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

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 µl
Gentamicina 50 µg/ml stock	10 µl
BSA F V (A-8022)	6 mg/ml

Filtrar 0,22 µm

Incubar al menos 2 horas antes de usar

C) Medio TALP-HEPES(Medio de lavado de ovocitos)

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	2 mM	16.8 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	10 mM	238 mg	--
Rojo Fenol	--	(1%) 100 µl; (0,5%) 200 µl	

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

D) Suplemento para TALP-HEPES

SUPLEMENTO: Para 10 ml de medio (agregar antes de filtrar para usar)		
Piruvato Na	0.2 mM	10 μ l
Gentamicina	50 μ g/ml stock	10 μ l
BSA F V (A-8022)		30 mg
Filtrar 0.22 μ m		
Temperar antes de usar		

E) Medio FERT-TALP (Medio de fecundación)

Componente (mM)	Concentración	100 ml (mg)	μ l stock sales
NaCl	114 mM	666 mg	2849 μ l - 4 M
KCl	3.2 mM	23.8 mg	319 μ l - 1 M
NaHCO₃	25 mM	210 mg	--
NaH₂PO₄	0.4 mM	4.8 mg	400 μ l - 0,1 M
Lactato de Na	10 mM	187 μ l	--
Ca Cl₂ x 2H₂O	2 mM	29.4 mg	200 μ l - 1 M
Mg Cl₂ x 6H₂O	0.5 mM	10 mg	492 μ l - 0,1 M
HEPES	--	238 mg	--
Rojo Fenol	--	(1%) 100 μ l;	(0,5%) 200 μ l

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

F) Suplemento para FERT-TALP

SUPLEMENTO: Para 10 ml de medio (agregar antes de filtrar para usar)		
Piruvato Na	0.2 mM	10 μ l
Gentamicina	50 μ g/ml stock	10 μ l
BSA Sigma (A-6003)		6 mg/ml
Filtrar 0.22 μ m		
Temperar antes de usar		
Al inseminar agregar heparina		

G) Medio SP-TALP para recuperación de espermatozoides

SP-TALP 10x		
(Medio utilizado para preparar gradiente de Percoll)		
Componente	25 ml (mg)	µl stock sales
NaCl	6250 µl	4 M
KCl	57.75 mg	775 µl - 1 M
NaH₂PO₄	9 mg	750 µl - 0,1 M
Ca Cl₂ x 2H₂O	73.5 mg	500 µl - 1 M
Mg Cl₂ x 6H₂O	20.25 mg	998 µl - 0,1 M
HEPES	595 mg	---

Mantener refrigerado (1 a 2 meses)

H) 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
NaH₂PO₄ (2H₂O)	1.19 mM	0.162 g	0.081 g
CaCl₂ (2H₂O)	1.71 mM	0.2514 g	0.1257
MgCl₂ (2H₂O)	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

I) Stock B

Componentes	Concentración	Cantidad/100 ml	Cantidad/50ml
NaHCO₃	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

J) Fluido Sintético del Oviducto Modificado, mSOF

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)
BME²	50 x	2 ml	1 ml
MEM³	100 x	1 ml	0,5 ml
Insulina⁴	10 µg/ml	100 µl (stock)	50ml (stock)
Sulfato de gentamicina⁵	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.

K) 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

ANEXO N° 3. Base de datos de la recuperación y selección de ovocitos de llama.

Tiempo (horas)	N° de ovarios	N° de Ovocitos Aspirados	N° de Ovocitos Seleccionados (CAT. 1 Y 2)
28	14	68	39
	12	52	36
	6	33	20
	18	93	49
	8	62	40
	6	36	22
	6	28	17
36	10	40	29
	4	39	24
	4	35	21
	10	60	37
	10	52	40
	6	70	45
	8	31	26
42	6	52	32
	8	61	25
	8	45	26
	10	84	37
	6	31	14
	8	53	38
	10	75	55

Fuente. Elaboración propia

ANEXO N° 4. Base de datos recogidos en el laboratorio de los tiempos en los estadios de maduración nuclear de ovocitos de llama.

Tiempo (horas)	N° de Ovocitos Seleccionados (CAT. 1 Y 2)	VG	GVBD	M I	M II	DG
28	39	0	1	15	19	4
	36	1	0	12	21	2
	20	1	1	8	7	3
	49	0	2	19	25	3
	40	1	2	15	21	1
	22	0	1	9	10	2
	17	1	0	6	9	1
36	29	0	2	6	19	2
	24	1	0	4	17	2
	21	1	1	5	10	4
	37	0	0	6	29	2
	40	1	0	8	29	2
	45	2	0	7	34	2
	26	0	0	5	21	0
42	32	1	0	2	28	1
	25	0	2	6	15	2
	26	0	0	8	16	2
	37	2	1	7	25	2
	14	0	0	2	11	1
	38	1	1	8	25	3
	55	1	2	8	40	4

Fuente. Elaboración propia

ANEXO N° 5. Base de datos transformados a arcoseno de los tiempos en los estadios de maduración nuclear de ovocitos de llama.

Tiempo (horas)	VG	GVBD	M I	M II	DG	VG	GVBD	M I	M II	DG
28	0.00	2.56	38.46	48.72	10.26	0.00	0.16	0.67	0.77	0.33
	2.56	0.00	33.33	58.33	5.56	0.16	0.00	0.62	0.87	0.24
	2.56	5.00	40.00	35.00	15.00	0.16	0.23	0.68	0.63	0.40
	0.00	4.08	38.78	51.02	6.12	0.00	0.20	0.67	0.80	0.25
	2.56	5.00	37.50	52.50	2.50	0.16	0.23	0.66	0.81	0.16
	0.00	4.55	40.91	45.45	9.09	0.00	0.21	0.69	0.74	0.31
	2.56	0.00	35.29	52.94	5.88	0.16	0.00	0.64	0.81	0.24
36	0.00	6.90	20.69	65.52	6.90	0.00	0.27	0.47	0.94	0.27
	2.56	0.00	16.67	70.83	8.33	0.16	0.00	0.42	1.00	0.29
	2.56	4.76	23.81	47.62	19.05	0.16	0.22	0.51	0.76	0.45
	0.00	0.00	16.22	78.38	5.41	0.00	0.00	0.41	1.09	0.23
	2.56	0.00	20.00	72.50	5.00	0.16	0.00	0.46	1.02	0.23
	5.13	0.00	15.56	75.56	4.44	0.23	0.00	0.41	1.05	0.21
	0.00	0.00	19.23	80.77	0.00	0.00	0.00	0.45	1.12	0.00
42	2.56	0.00	6.25	87.50	3.13	0.16	0.00	0.25	1.21	0.18
	0.00	8.00	24.00	60.00	8.00	0.00	0.29	0.51	0.89	0.29
	0.00	0.00	30.77	61.54	7.69	0.00	0.00	0.59	0.90	0.28
	5.13	2.70	18.92	67.57	5.41	0.23	0.17	0.45	0.96	0.23
	0.00	0.00	14.29	78.57	7.14	0.00	0.00	0.39	1.09	0.27
	2.56	2.63	21.05	65.79	7.89	0.16	0.16	0.48	0.95	0.28
	2.56	3.64	14.55	72.73	7.27	0.16	0.19	0.39	1.02	0.27

Fuente. Elaboración propia

ANEXO N° 6. Base de datos recogidos en el laboratorio para el desarrollo embrionario de 36 y 42 horas de maduración *in vitro* de ovocitos de llama.

Tiempo (horas)	Numero de Ovocitos Maduros	Segmentación (48 h)	Mórula (96 h)	Blastocisto (7 días)
36	20	11	8	1
	28	15	10	2
	18	8	6	1
42	30	17	14	2
	24	11	8	1
	26	12	9	2

Fuente. Elaboración propia

ANEXO N° 7. Base de datos transformados a arcoseno para el desarrollo embrionario de 36 y 42 horas de maduración *in vitro* de ovocitos de llama.

Tiempo (horas)	SEG	MOR	BLAS	SEG	MOR	BLAS
36	55.00	72.73	9.09	0.84	1.02	0.31
	53.57	66.67	13.33	0.82	0.96	0.37
	44.44	75.00	12.50	0.73	1.05	0.36
42	56.67	82.35	11.76	0.85	1.14	0.35
	45.83	72.73	9.09	0.74	1.02	0.31
	46.15	75.00	16.67	0.75	1.05	0.42

Fuente. Elaboración propia

11

ANEXO N° 8. PROCESAMIENTO DE DATOS

Cuadro N°3: Procedimiento ANOVA para Vesícula germinal.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.000	2	.000	.025	.976
Intra-grupos	.159	18	.009		
Total	.160	20			

Fuente: Elaboración propia (SPSS V.15.0)

Cuadro N° 4: Procedimiento ANOVA para Vesícula germinal rota.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.021	2	.011	.842	.447
Intra-grupos	.229	18	.013		
Total	.250	20			

Fuente: Elaboración propia (SPSS V.15.0)

Cuadro N° 5: Procedimiento ANOVA para Metafase I.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.224	2	.112	24.697	.000
Intra-grupos	.082	18	.005		
Total	.305	20			

Fuente: Elaboración propia (SPSS V.15.0)

Cuadro N° 6: Comparaciones entre tratamientos con la prueba de Duncan para el estadio de metafase I.

TIEMPO EN HORAS	N	Subconjunto para alfa = .05	
	1	2	1
42 horas	7	.43688714	.66150286 1.000
36 horas	7	.44856714	
28 horas	7		
Sig.		.749	

Fuente: Elaboración propia (SPSS V.15.0)

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7.000.

Cuadro N° 7: Procedimiento ANOVA para Metafase II.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.233	2	.117	10.657	.001
Intra-grupos	.197	18	.011		
Total	.430	20			

Fuente: Elaboración propia (SPSS V.15.0)

Cuadro N° 8: Comparaciones entre tratamientos con la prueba de Duncan para el estadio de metafase II.

TIEMPO EN HORAS	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
28 horas	7	.77649571	
36 horas	7		.99735429
42 horas	7		1.00273429
Sig.		1.000	.924

Fuente: Elaboración propia (SPSS V.15.0)

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7.000.

Cuadro N° 9: Procedimiento ANOVA para ovocitos degenerados.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.004	2	.002	.243	.787
Intra-grupos	.151	18	.008		
Total	.155	20			

Fuente: Elaboración propia (SPSS V.15.0)

Cuadro N° 10: Procedimiento ANOVA para segmentación de ovocitos maduros.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.000	1	.000	.089	.781
Intra-grupos	.014	4	.004		
Total	.015	5			

Fuente: Elaboración propia (SPSS V.15.0)

Cuadro N° 11: Procedimiento ANOVA para mórula de ovocitos maduros.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.006	1	.006	1.855	.245
Intra-grupos	.012	4	.003		
Total	.017	5			

Fuente: Elaboración propia (SPSS V.15.0)

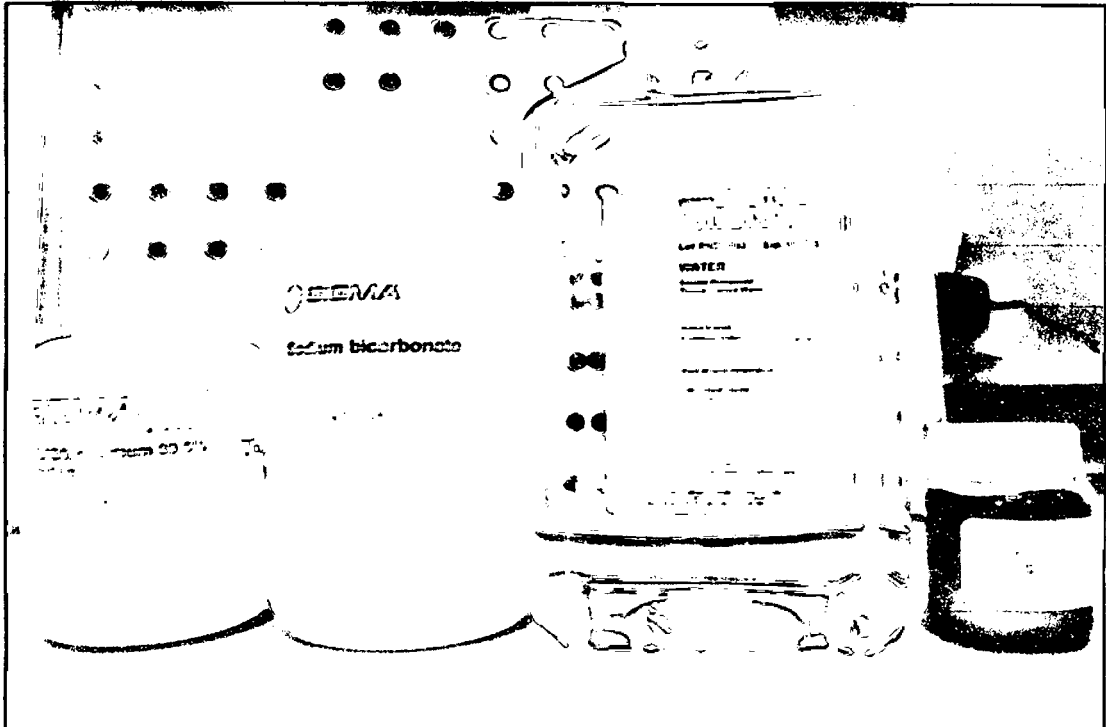
Cuadro N° 12: Procedimiento ANOVA para blastocisto de ovocitos maduros

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.000	1	.000	.091	.778
Intra-grupos	.009	4	.002		
Total	.009	5			

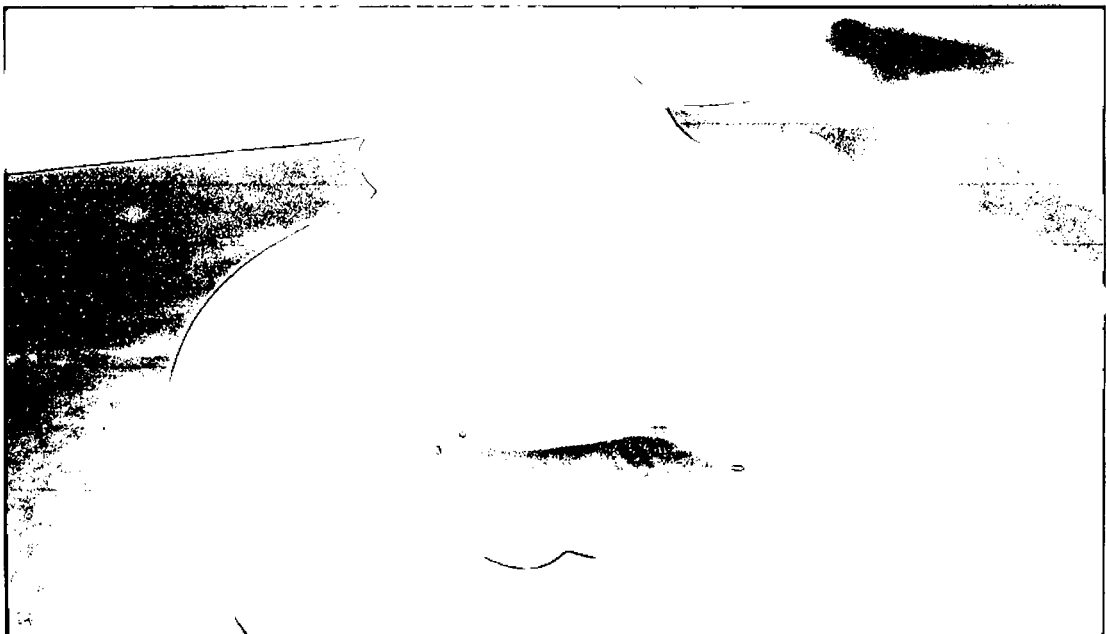
Fuente: Elaboración propia (SPSS V.15.0)

ANEXO N° 9.FOTOGRAFIAS

Fotografia 1. Componentes de los medios de maduración



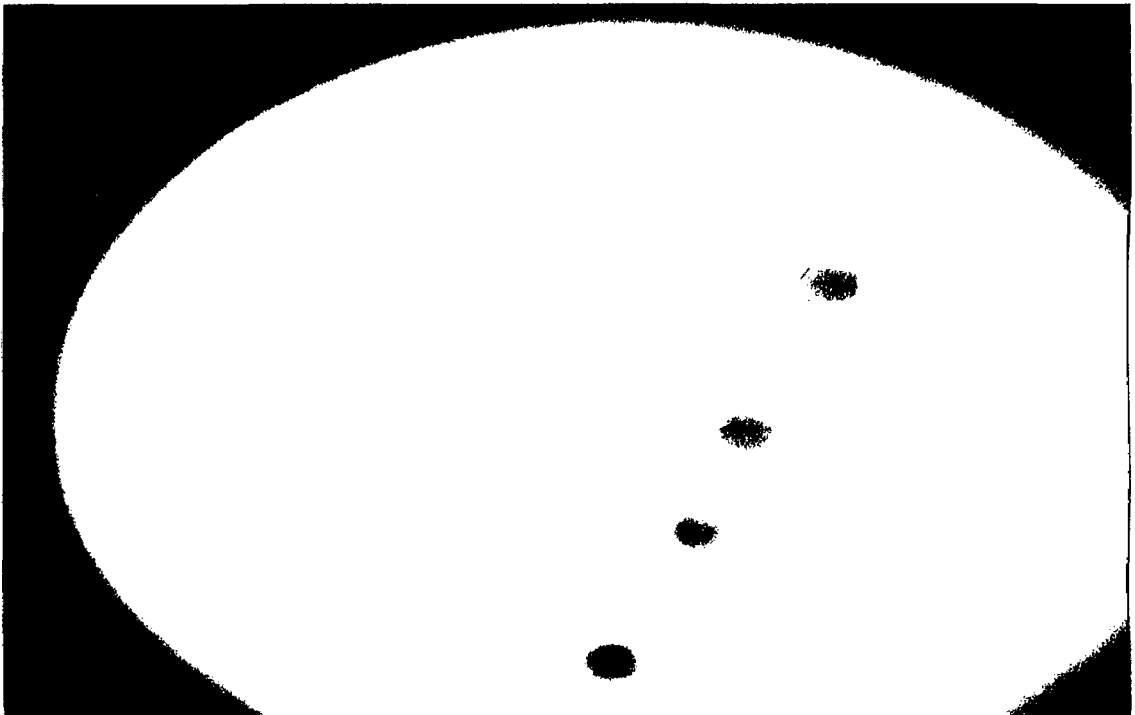
Fotografia 2. Ovario de llama con foliculos



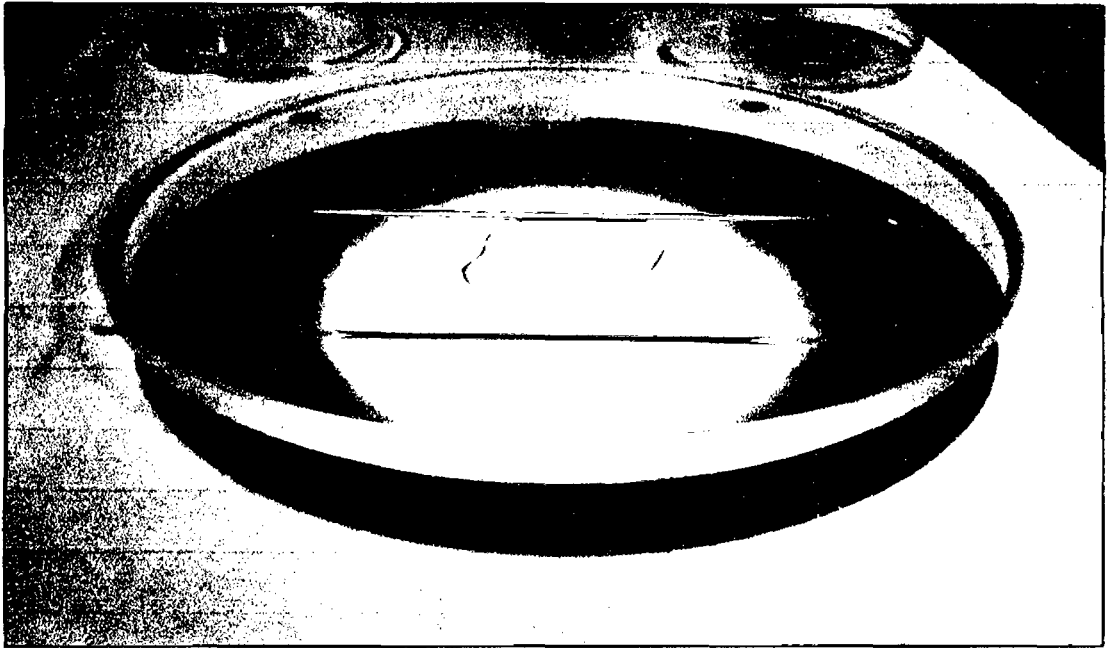
Fotografía 3. Aspiración folicular de ovarios de alpaca. Jeringa de 10 ml con aguja 21G



Fotografía 4. Selección de COCs de llama.



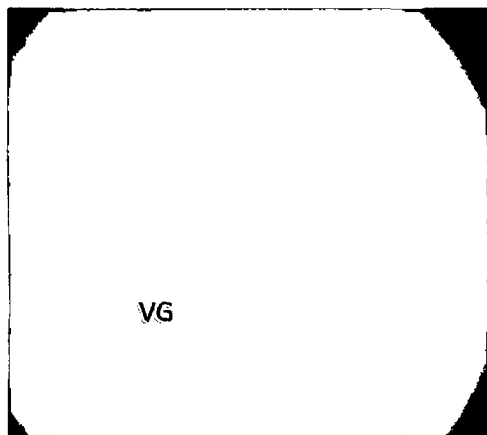
Fotografía 5. Fijación y tinción de ovocitos madurados sobre Estereoscopio Lavomet CSM2



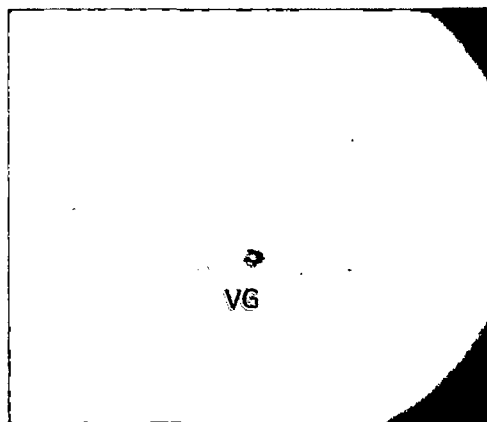
Fotografía 6. Evaluación de los estadios de maduración nuclear en el Microscopio invertido trinocular Novel Ningbo XDS-403AT.



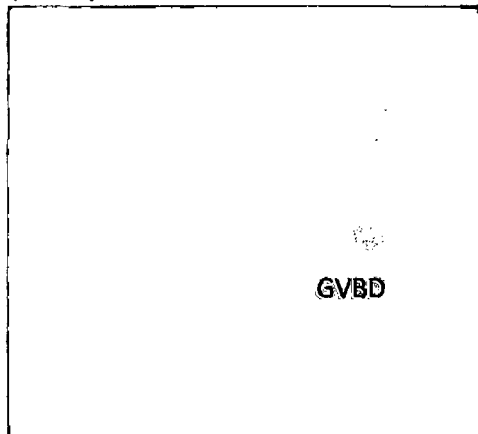
Fotografía 7. Vesícula Germinal (VG)



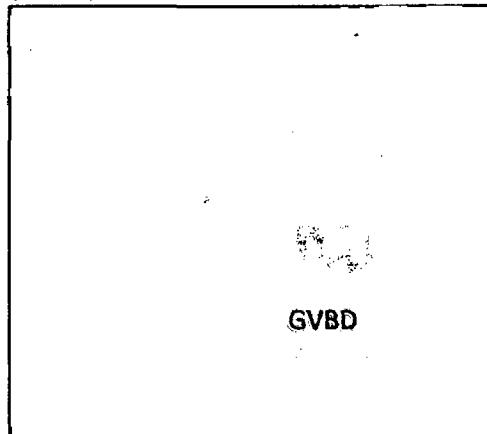
Fotografía 8. Vesícula Germinal (VG)



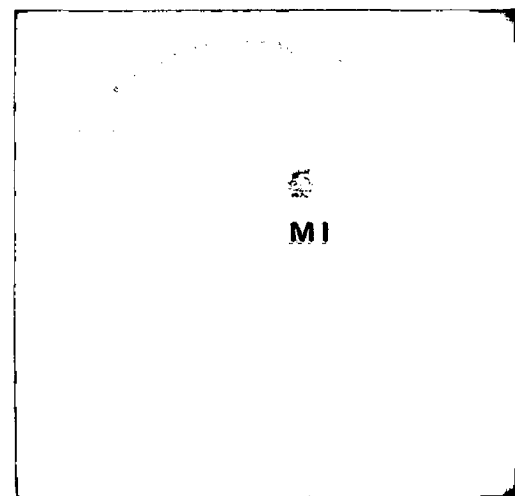
Fotografía 9. Vesícula Germinal rota (GVBD)



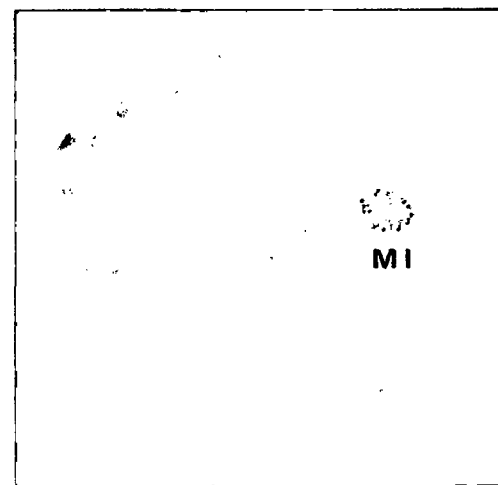
Fotografía 10. Vesícula Germinal rota (GVBD)



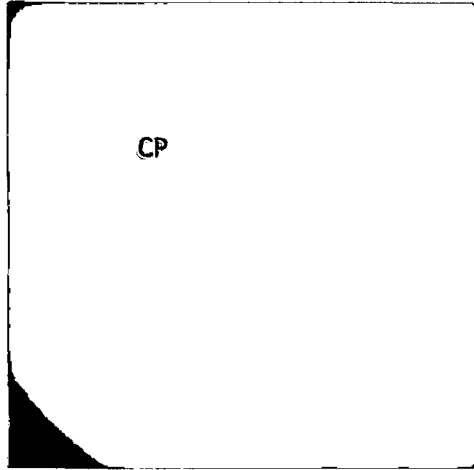
Fotografía 11. Metafase I (M I)



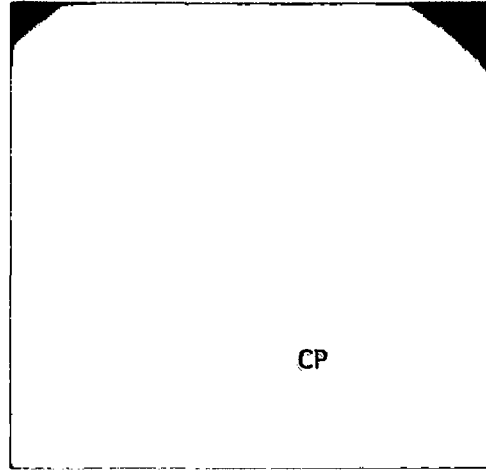
Fotografía 12. Metafase I (M I)



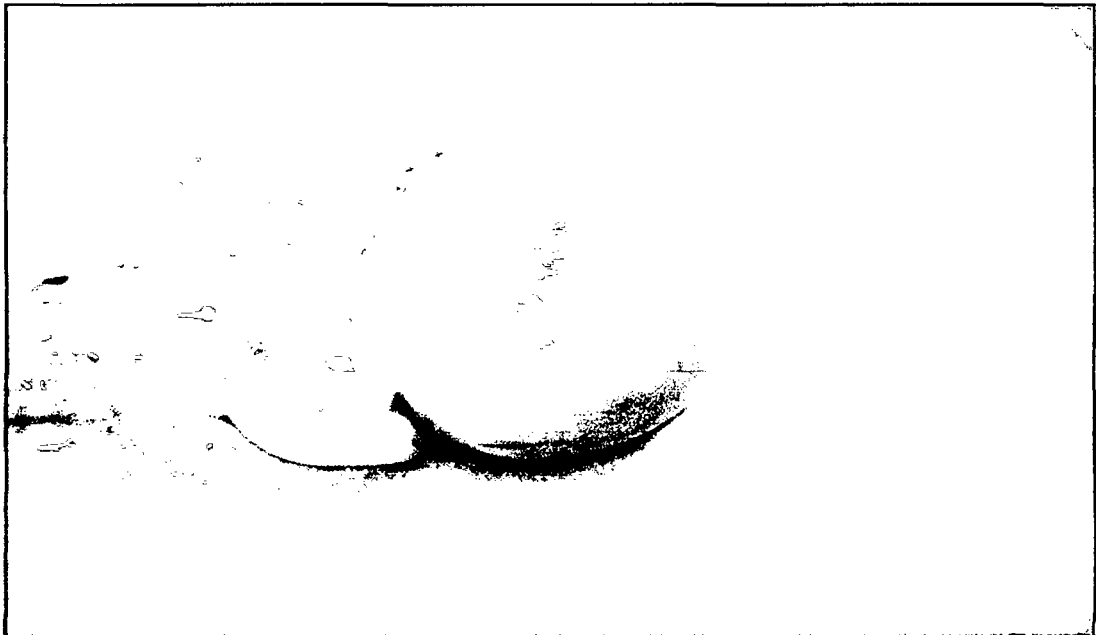
Fotografía 12. Metafase II (M II) Presencia de corpúsculo polar



Fotografía 13. Metafase II (M II)



Fotografía 14. Testículo de llama



Fotografía 15. Epidídimo del testículo de llama



Fotografía 16. Técnica de swim-up



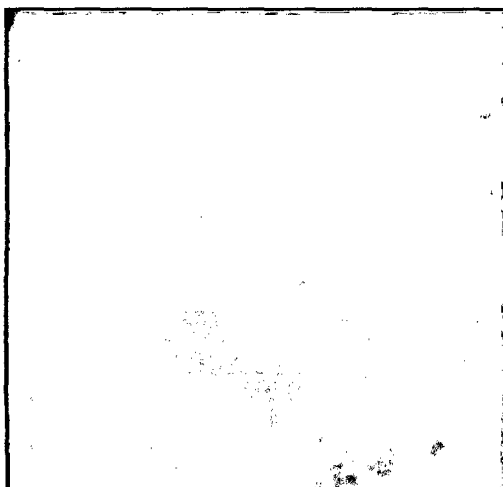
Fotografía 17. Embrión de 2 células



Fotografía 18. Embrión de 4 células



Fotografía 19. Embrión en estado de mórula.



Fotografía 20. Embrión en estado de blastocisto a los 7 días

