

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCABELICA**

(Creada por Ley N°25265)

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



**TESIS**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD MEIÓTICA DE OVOCITOS  
DE ALPACAS (*Vicugna pacos*) RECUPERADOS POR SISTEMA  
*Ovum pick up* (OPU) Y DE OVARIOS OBTENIDOS POST MORTEM**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:**

REPRODUCCIÓN ANIMAL

**PRESENTADO POR:**

Bach. Teddy Ronnie, GASTELU TORRES

Bach. Michele Esthefany, ZUÑIGA LANDEO

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

INGENIERO ZOOTECNISTA

**HUANCAVELICA- PERÚ**

**2019**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCAVELICA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍA**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

En el Auditorium de la Facultad de Ciencias de Ingeniería, a los 05 días del mes de diciembre del año 2019, a horas 3:00 p.m, se reunieron los miembros del Jurado Calificador conformado por los siguientes: **Ing. Paul Herber MAYHUA MENDOZA (PRESIDENTE)**, **Mg. Blas REYMUNDO CONDOR (SECRETARIO)**, **M.Sc. Rufino PAUCAR CHANCA (VOCAL)**, designados con Resolución de Decano N° 175-2018-FCI-UNH, de fecha 12 de diciembre del 2018, así mismo se modifica el título del proyecto de tesis con Resolución de Decano N°232-2019-FCI-UNH, de fecha 27 de noviembre del 2019 y con Resolución de Decano N° 250-2019-FCI-UNH de fecha 03 de diciembre del 2019 se ratifica al Asesor y Jurados evaluadores, a fin de proceder con la calificación de la sustentación del informe final de tesis titulado: "EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD MEIÓTICA DE OVOCITOS DE ALPACAS (*Vicugna pacos*) RECUPERADOS POR SISTEMA *Ovum pick up* (OPU) Y DE OVARIOS OBTENIDOS POST MORTEM", presentado por las Bachilleres **Michele Esthefany ZUÑIGA LANDEO** y **Teddy Ronnie GASTELU TORRES**, para optar el **Título Profesional de Ingeniero Zootecnista**; en presencia del **Ing. Marino ARTICA FÉLIX**, como Asesor del presente trabajo de tesis. Finalizado la evaluación a horas 4.25 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:

**Michele Esthefany ZUÑIGA LANDEO**  
 APROBADO  POR... mayoria

DESAPROBADO

**Teddy Ronnie GASTELU TORRES**  
 APROBADO  POR... mayoria

DESAPROBADO

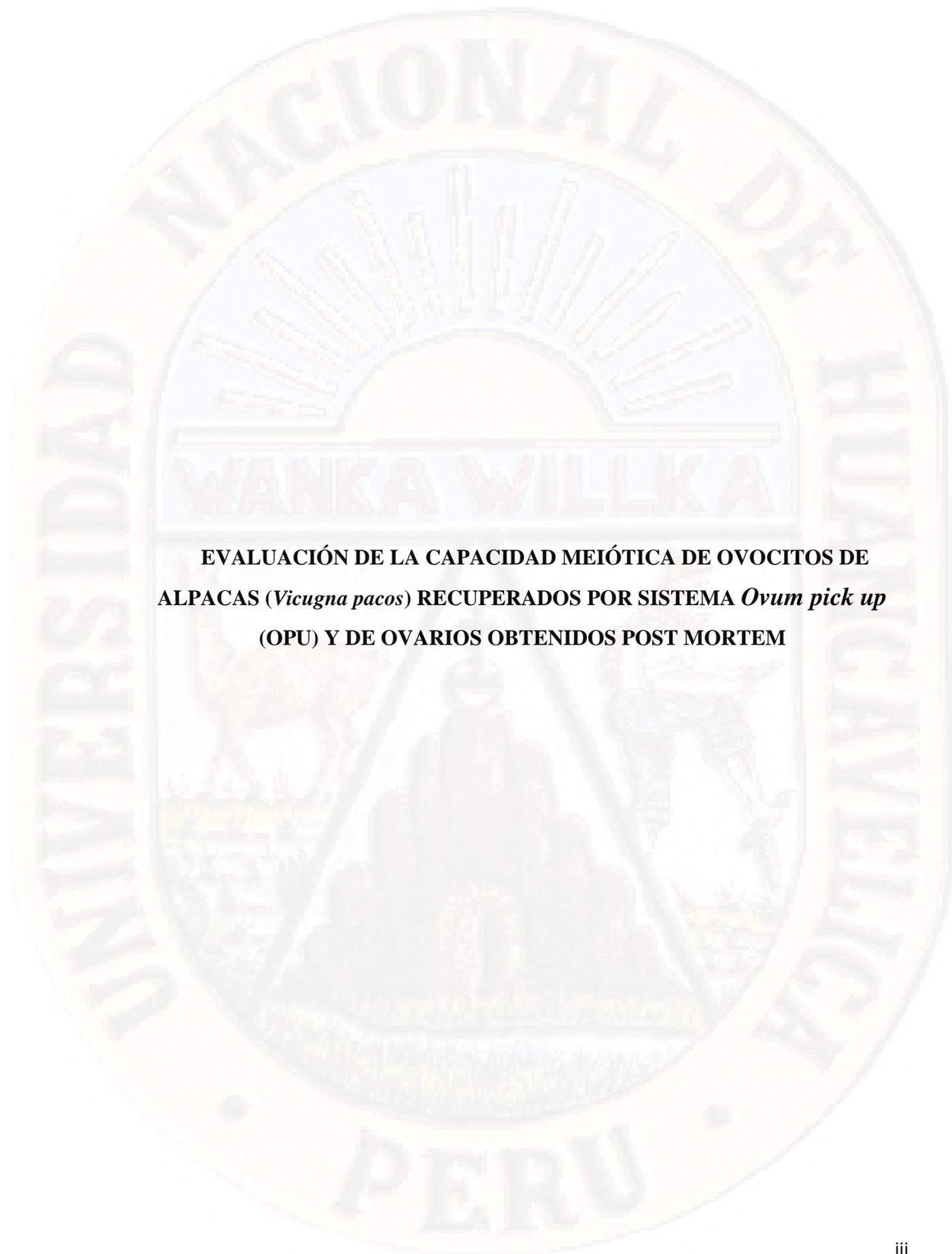
En señal de conformidad, firmamos a continuación:

  
 \_\_\_\_\_  
 Presidente

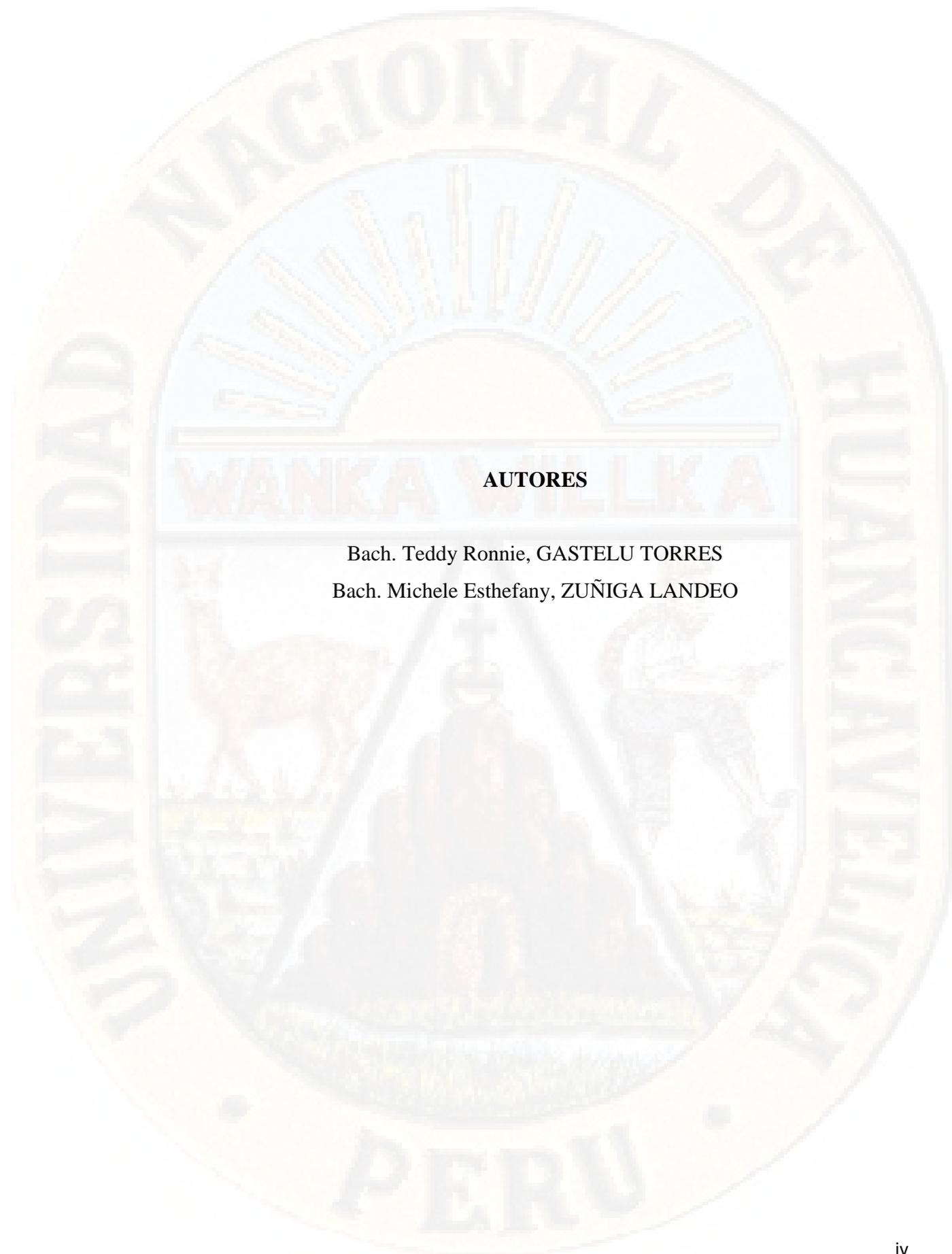
  
 \_\_\_\_\_  
 Secretario

  
 \_\_\_\_\_  
 Vocal

  
 \_\_\_\_\_  
 Vº Bº Decano

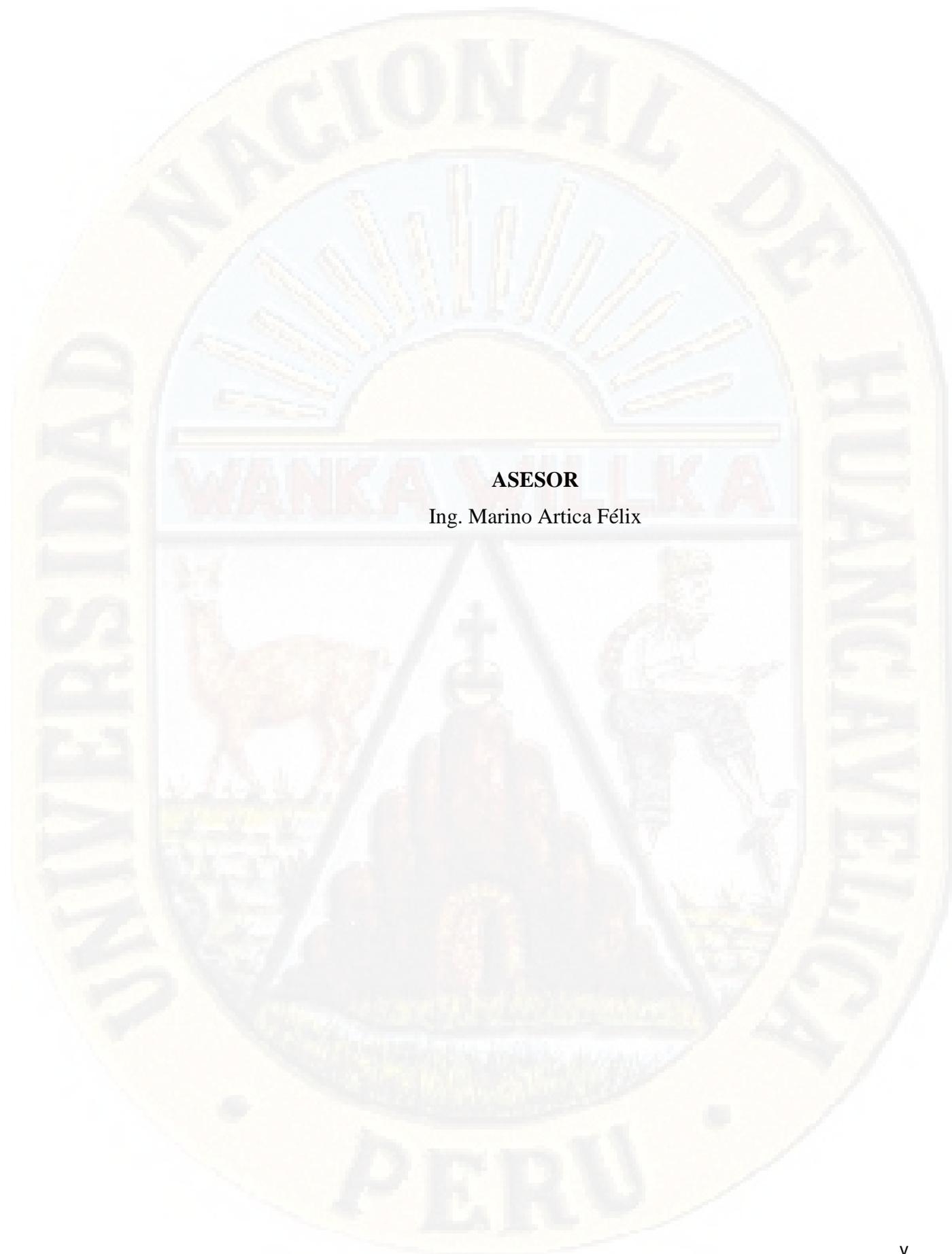


**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD MEIÓTICA DE OVOCITOS DE  
ALPACAS (*Vicugna pacos*) RECUPERADOS POR SISTEMA *Ovum pick up*  
(OPU) Y DE OVARIOS OBTENIDOS POST MORTEM**



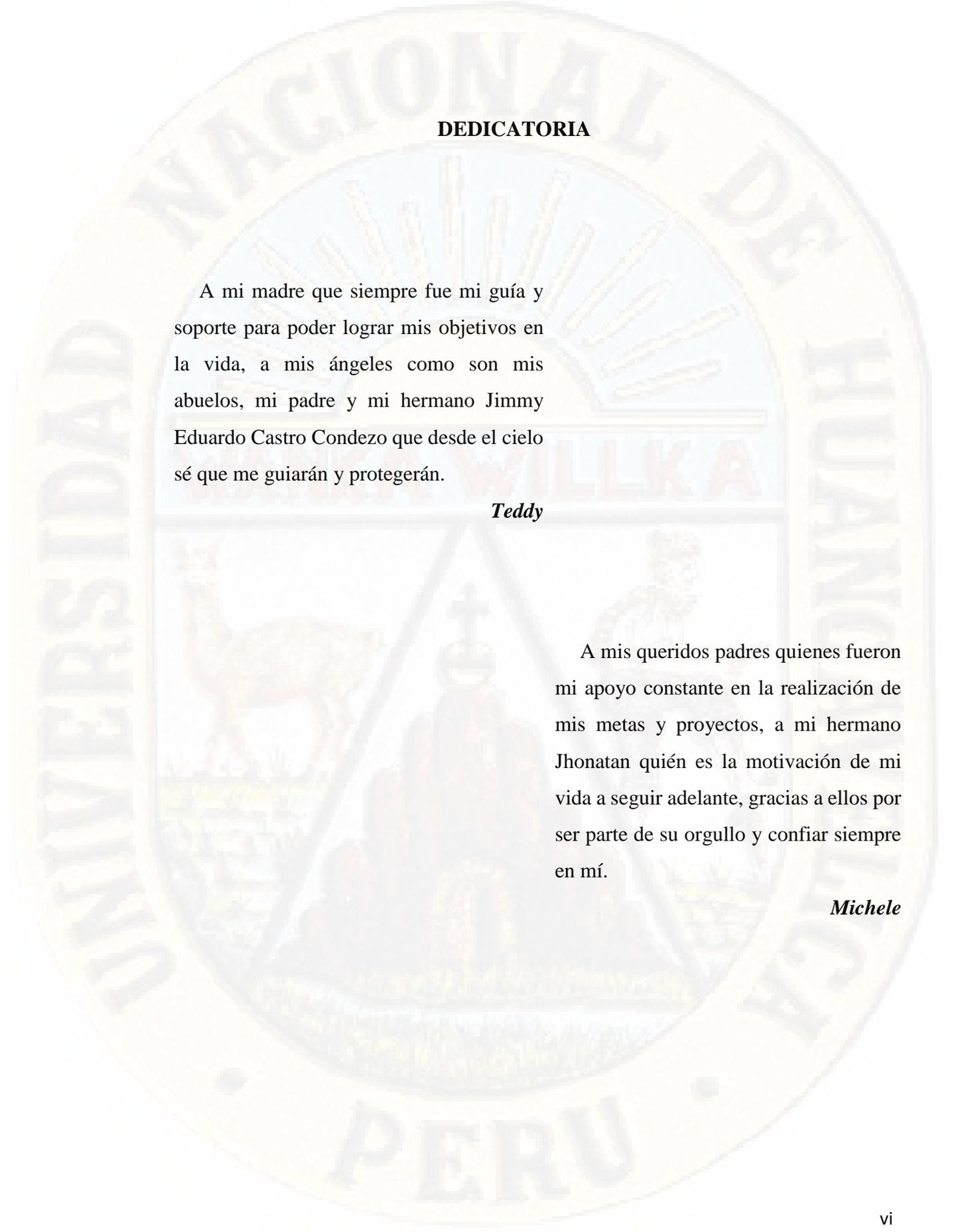
**AUTORES**

Bach. Teddy Ronnie, GASTELU TORRES  
Bach. Michele Esthefany, ZUÑIGA LANDEO



**ASESOR**

Ing. Marino Artica Félix



## DEDICATORIA

A mi madre que siempre fue mi guía y soporte para poder lograr mis objetivos en la vida, a mis ángeles como son mis abuelos, mi padre y mi hermano Jimmy Eduardo Castro Condezo que desde el cielo sé que me guiarán y protegerán.

*Teddy*

A mis queridos padres quienes fueron mi apoyo constante en la realización de mis metas y proyectos, a mi hermano Jhonatan quién es la motivación de mi vida a seguir adelante, gracias a ellos por ser parte de su orgullo y confiar siempre en mí.

*Michele*

## AGRADECIMIENTOS

Al Señor Director de la Escuela Profesional de Zootecnia y al Jefe del Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de Facultad de Ciencias de Ingeniería que nos brindaron las herramientas necesarias y valiosas que contribuyeron a nuestra formación profesional, de igual manera al Señor Rector y autoridades de la Universidad Nacional de Huancavelica.

Al Ing. Marino Artica Félix asesor del proyecto de tesis por su guía, comprensión, paciencia, entrega y valiosos consejos a lo largo del proceso de investigación.

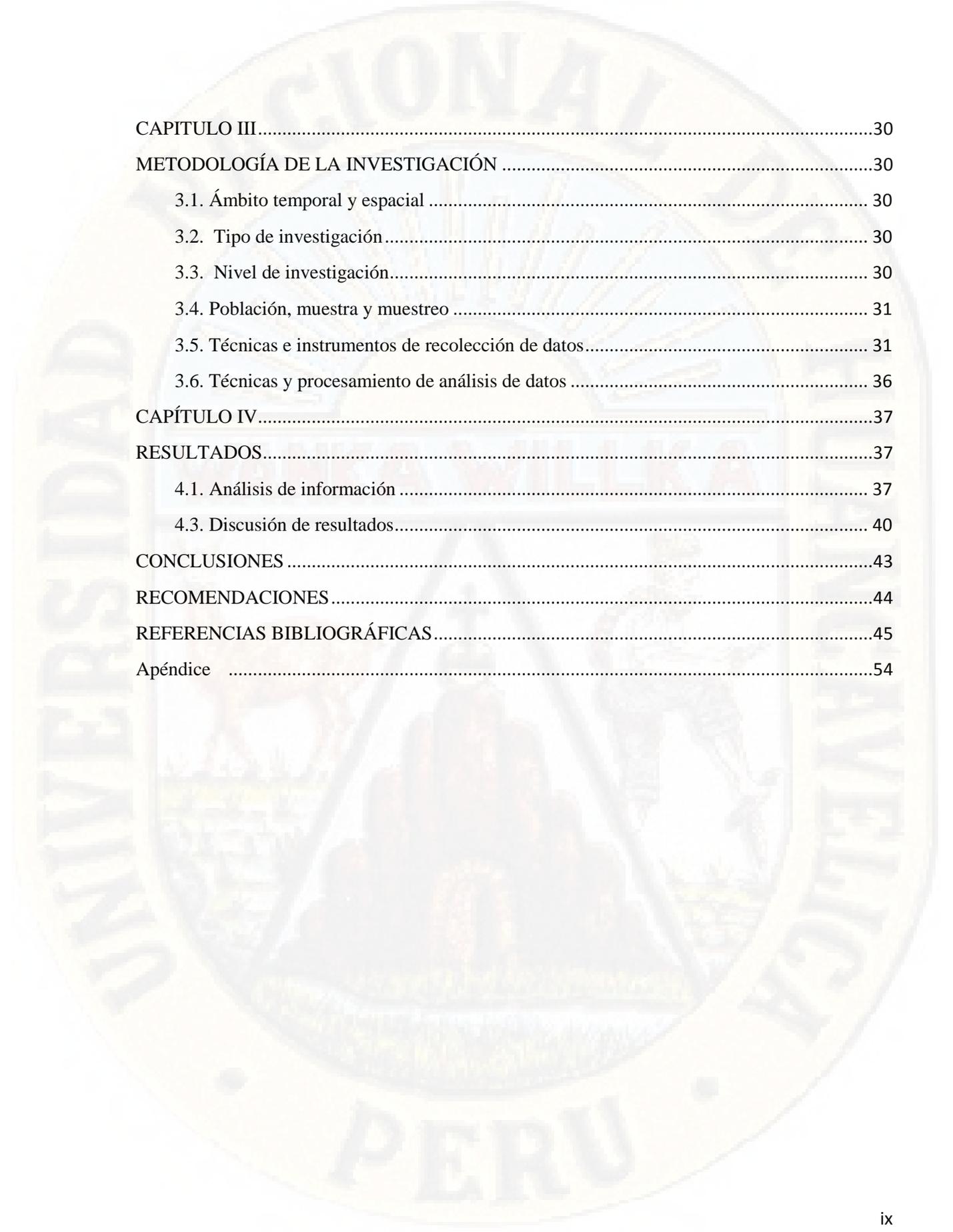
Al Dr. Jaime Antonio Ruiz Bejar y M.Sc. Leandra Landeo Jurado por brindarnos su asesoría.

Al proyecto FOCAM: “Optimización de la fecundación *in vitro* para la conservación del material genético de las alpacas (*Vicugna pacos*) de la Comunidad Campesina de Carhuancho Distrito de Pilpichaca, Provincia de Huaytará Región Huancavelica”, por brindarnos recursos como materiales, equipos y asistencia técnica a lo largo de nuestra investigación de tesis.

Al personal encargado del Camal Municipal de Huancavelica, por brindarnos las facilidades y el uso de sus instalaciones para la recolección de muestras.

## ÍNDICE

DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTOS .....	vii
RESUMEN .....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN .....	xiii
CAPITULO I .....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	1
1.1. Descripción del problema .....	1
1.2. Formulación del problema .....	3
1.3. Objetivos .....	3
1.4. Justificación .....	4
1.5. Limitaciones.....	6
CAPITULO II .....	7
MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Antecedentes .....	7
2.1.1. A nivel Internacional .....	7
2.1.2. A nivel Nacional.....	10
2.1.3. A nivel regional .....	12
2.2. Bases Teóricas .....	13
2.2.1. Fisiología ovárica .....	13
2.2.2. Maduración del ovocito .....	16
2.2.3. Técnicas de recuperación de Complejos Ovocito Cúmulus (COCs).....	18
2.2.4. Producción <i>in vitro</i> de embriones (PIV).....	21
2.3. Bases conceptuales.....	26
2.4. Definición de términos.....	27
2.5. Variables .....	29
2.6. Operacionalización de variables .....	29



CAPITULO III.....	30
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN .....	30
3.1. Ámbito temporal y espacial .....	30
3.2. Tipo de investigación.....	30
3.3. Nivel de investigación.....	30
3.4. Población, muestra y muestreo .....	31
3.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	31
3.6. Técnicas y procesamiento de análisis de datos .....	36
CAPÍTULO IV.....	37
RESULTADOS.....	37
4.1. Análisis de información .....	37
4.3. Discusión de resultados.....	40
CONCLUSIONES .....	43
RECOMENDACIONES .....	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
Apéndice .....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de meiosis en mamíferos .....	14
<b>Figura 2.</b> Representación de los factores que intervienen en formación de células germinales primordiales (PGC), la ovogénesis y foliculogénesis.....	16
<b>Figura 3.</b> Fases del crecimiento, capacitación y maduración durante la foliculogénesis del ovocito .....	17

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Clasificación del Complejo Ovocito-Cúmulo (COCs) de Alpaca. ....	21
<b>Tabla 2</b> Operacionalización de variables .....	29
<b>Tabla 3</b> Numero de folículos aspirados, COCs colectados y calidad de ovocitos colectados por <i>Ovum pick up</i> (OPU) y aspiración folicular de ovarios de camal .....	37
<b>Tabla 4</b> Capacidad meiótica de ovocitos recuperados por <i>Ovum pick up</i> (OPU) y ovarios de camal. ....	39

## RESUMEN

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Escuela Profesional de Zootecnia de la Universidad Nacional de Huancavelica, con el objetivo de evaluar la calidad del complejo ovocitos cúmulos (COCs) mediante el sistema *Ovum pick up* (OPU) en alpacas (*Vicugna pacos*) y evaluar la capacidad meiótica frente a los COCs provenientes de ovarios obtenidos del Camal Municipal de Huancavelica. Para el estudio se utilizaron 30 ovarios de 15 alpacas hembras vivas y 30 ovarios de 15 alpacas beneficiadas del camal, de las cuales 13 alpacas donantes de COCs fueron evaluadas a la respuesta ovárica a la superestimulación con 200 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG), donde se detectaron 67 folículos  $\geq 5$  mm como respuesta a los tratamientos de superestimulación con una tasa de colección de ovocitos de 51.54%. Con la técnica OPU se recuperó 50 COCs/alpaca vs 128 COCs/ovario evidenciando diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ). Todos los datos se analizaron con el programa Infostat versión estudiantil 2008. En cuanto a la calidad de COCs obtenida por la técnica OPU, se registraron 6.15; 17.69; 36.54 y 31.92% de COCs de calidad I, II, III y IV respectivamente, frente a 56.2; 15.0; 16.4 y 12.5% de COCs de calidad I, II, III y IV respectivamente para ovocitos recuperados de ovarios obtenidos post mortem, donde la técnica OPU influyó negativamente sobre la calidad de COCs ( $P > 0.05$ ), a diferencia que el otro método donde se obtuvo el mayor porcentaje de calidad I. Se utilizaron ovocitos de calidad 1 y 2 para la maduración *in vitro* de ovocitos, fertilización *in vitro* y cultivo *in vitro* de embriones hasta el día 7. Finalmente se evaluó la capacidad meiótica de COCs obtenidos por ambos métodos, donde se obtuvo tasas de división [(57.62  $\pm$  22.08) % y (49  $\pm$  11.47) %] y mórulas [(55.6  $\pm$  23.82) % y (42  $\pm$  10.39) %] similares de aquellos COCs recuperados por OPU y ovarios obtenidos post mortem respectivamente, sin mostrar diferencias estadísticas significativas ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, la tasa de blastocistos temprano por sistema OPU (55.69  $\pm$  23.82) % fue superior a las tasas de blastocistos tempranos obtenidos de los ovarios de camal (34,6  $\pm$  2,90) %, respectivamente ( $P < 0.05$ ). Se concluye que las mejores tasas de desarrollo embrionario se obtienen a partir de la técnica OPU que de aquellos recuperados por ovarios obtenidos post mortem, el resultado depende de la técnica del operador al momento de realizar la aspiración folicular de COCs mediante esta técnica.

**Palabras clave:** alpaca, ovocito, ovario, blastocisto, *Ovum pick up*,

## ABSTRACT

The present study was carried out in the Laboratory of Reproductive Biotechnologies of the Professional School of Zootechnics of the National University of Huancavelica, with the objective to evaluate the quality of the complex oocytes cumulus (COCs) by means of the Ovum pick up system (OPU) in alpacas (*Vicugna pacos*) and to evaluate the meiotic capacity against the COCs coming from ovaries obtained from the Municipal Camal of Huancavelica. For the study, 30 ovaries from 15 live female alpacas and 30 ovaries from 15 alpacas benefited from the camal were used, of which 13 alpaca donors of COCs were evaluated to ovarian response to overstimulation with 200 UI of Equine Chorionic Gonadotropin (eCG), where 67 follicles were detected  $\geq 5$  mm in response to overstimulation treatments with an oocyte collection rate of 51.54%. With the OPU technique, 50 COCs/alpaca vs 128 COCs/ovarium were recovered, showing significant statistical differences ( $P < 0.05$ ). All data were analyzed with the program Infostat student version 2008. Regarding the quality of COCs obtained by the OPU technique, 6.15; 17.69; 36.54 and 31.92% of quality I, II, III and IV COCs were recorded, respectively, compared to 56.2; 15.0; 16.4 and 12.5% of quality I, II, III and IV COCs respectively for oocytes retrieved from ovaries obtained post mortem, where the OPU technique negatively influenced the quality of COCs ( $P > 0.05$ ), unlike the other method where the highest percentage of quality I was obtained. Quality 1 and 2 oocytes were used for in vitro maturation of oocytes, in vitro fertilization and in vitro culture of embryos until day 7. Finally, the meiotic capacity of COCs obtained by both methods was evaluated, with similar division rates [ $(57.62 \pm 22.08) \%$  and  $(49 \pm 11.47) \%$ ] and morules [ $(55.6 \pm 23.82) \%$  and  $(42 \pm 10.39) \%$ ] of those COCs recovered by OPU and ovaries obtained post mortem respectively, without showing significant statistical differences ( $P > 0.05$ ). However, the early blastocyst rate per OPU system  $(55.69 \pm 23.82) \%$  was higher than the early blastocyst rates obtained from the camal ovaries  $(34.6 \pm 2.90) \%$ , respectively ( $P < 0.05$ ). It is concluded that the best rates of embryonic development are obtained from the OPU technique than from those recovered from ovaries obtained post mortem, the result depends on the technique of the operator at the time of follicular aspiration of COCs by this technique.

**Key words:** alpaca, oocyte, ovary, blastocyst, *Ovum pick up*.

## INTRODUCCIÓN

Los primeros trabajos de investigación en camélidos sudamericanos usando la Fecundación *in vitro* (FIV), fueron gametos provenientes de animales beneficiados, esta información ha servido de gran ayuda porque se ha intentado estandarizar los protocolos de maduración y fecundación *in vitro*, una alternativa más para la recuperación de complejos ovocitos cúmulus (COCs) de alpacas *in vivo*, es el uso de la técnica aspiración transvaginal guiada por ultrasonografía, ya que se sabe que en esta especie las hembras solo pueden llegar a tener en forma natural 4 a 5 crías en toda su vida reproductiva y así maximizar el potencial genético deseable de las hembras en esta especie.

La recuperación de COCs por aspiración folicular transvaginal pueden llegar a ser fecundados *in vitro* con los espermatozoides de los machos genéticamente superiores, para ser cultivados y posteriormente transferirlos a hembras receptoras previamente sincronizadas, así también una alpaca donante podría llegar a tener varias crías al año recuperando sus ovocitos en sesiones repetidas y siendo transferidas a alpacas receptoras (Ruiz, 2019). Actualmente existe escasa información en cuanto a reportes de recuperación de COCs de alpacas con el uso de esta técnica (Huanca et al., 2006 y Gamarra, Gallegos, Alvarado, Asparrin y Vivanco, 2007) así mismo en llamas (Brogliatti, Palasz, Rodriguez, Mapletoft, Adams, 2000 y Ratto, Berland, Huanca, Singh, Adams, 2005), lo ausente en estas investigaciones es una evaluación sobre la competencia de desarrollo de los ovocitos en alpacas y llamas después de su fecundación *in vitro* hasta la fecha. Sólo se han fecundado ovocitos de llama recuperados por aspiración transvaginal por Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) (Sansinema et al., 2007) y FIV (Berland et al., 2011), bajo estas consideraciones, el objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad meiótica de Complejo Ovocitos Cúmulus (COCs) mediante el sistema *Ovum pick up* (OPU) en alpacas (*Vicugna pacos*) y los COCs provenientes de ovarios post mortem.

## CAPITULO I

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 1.1.Descripción del problema

El Perú alberga el 87% de la población de camélidos sudamericanos (CSA) con 3 685 516 entre alpacas, llamas, vicuñas y guanacos (INEI, 2012). Así mismo, Huancavelica ocupa el cuarto lugar con una población de 308 586 alpacas después de Puno, Cusco y Arequipa (INEI, 2012). La crianza de CSA se ha convertido en una actividad económica de gran importancia para el sector alto andino del país, donde involucra a una gran parte de la población rural de aproximadamente 2,9 millones de habitantes, cuyos ingresos económicos dependen de la comercialización de fibra y carne (Fernandez, 1991).

Sin embargo, esta actividad se lleva a cabo bajo sistemas tradicionales no siempre eficaces, las altas tasas de mortalidad, morbilidad y baja eficiencia reproductiva donde se evidencia consanguinidad con un consecuente deterioro de la calidad genética de los rebaños. La aplicación de tecnologías reproductivas (TR), como la inseminación artificial (IA), transferencia de embriones (TE) y la producción *in vitro* de embriones (PIE) pueden contribuir a superar estos bajos índices reproductivos y permitir la multiplicación de animales de alto valor genético.

Por otro lado, la fecundación *in vitro* (FIV) es una herramienta donde la producción de embriones se lleva a cabo bajo sistemas *in vitro* y la cantidad de insumos y hormonas utilizadas es mínima y debido a ello resulta una tecnología atractiva para acelerar la multiplicación de animales genéticamente superiores. En ese sentido, para implementar un programa de mejoramiento genético mediante la FIV se requieren usar gametos de animales de alto valor genético, para ello es indispensable estandarizar un protocolo de recuperación de complejo ovocito cúmulus (COCs) de hembras donantes por el sistema

*Ovum pick up* (OPU) y evaluar la capacidad meiótica de estos ovocitos, ya que los reportes de producción *in vitro* de embriones utilizando gametos de camal no han superado los 50% de desarrollo embrionario y su utilidad está supeditado solamente a la estandarización de protocolos de FIV.

La técnica de aspiración folicular mediante OPU consiste en recuperar COCs desde hembras vivas previamente sincronizadas, con la ayuda de un transductor vaginal adosado a una guía de punción, que está dispuesta junto a los cristales de transmisión de imagen caudal al cérvix y al ovario a puncionar y se coloca a la derecha o a la izquierda según la posición de folículo a puncionar. El dispositivo se manipula desde el exterior de la hembra con una mano, mientras la otra mano es introducida en el canal rectal para fijar el ovario contra el transductor, visualizándose el ovario y los folículos en la imagen ecográfica. Una vez fijado el ovario, la aguja es visualizada en el sector y con movimientos suaves y cuidadosos es perforada la pared vaginal y los folículos son puncionados, de esta manera el líquido folicular es aspirado con una bomba de vacío y recolectados en un tubo colector conteniendo un buffer fosfato salino (PBS) (Corredor, y Páez, 2012). La OPU generalmente es realizada posterior a un protocolo de superestimulación ovárica de la hembra donante.

La colección de COCs por OPU en alpacas y llamas podría ser una técnica repetible y de fácil aplicación ya que esta es una técnica poco invasiva y no conlleva riesgos a las donantes durante su aplicación. Además, los COCs colectados por esta técnica pueden ser utilizados para la producción de embriones ICSI, FIV, bipartición y *handmade cloning*, (HMC) (Ruiz y Ratto, 2011). Por otro lado, la mayoría de los reportes de producción *in vitro* de embriones en CSA han sido realizados utilizando COCs provenientes de camal, en alpacas: Ruiz y col.,(2011), Ruiz et al. (2013), Huanca (2012) y Perez, Zeballos y Perez-U, (2017), los cuales solo tienen fines de investigación mas no contribuyen al mejoramiento genético debido a que los gametos utilizados son provenientes de animales destinados a descarte con caracteres productivos como finura y peso de vellón no deseables para transmitir en las siguientes generaciones. Además, los COCs provenientes de camal se encuentran en diferentes

estadios de desarrollo meiótico, motivo por el cual las tasas de desarrollo embrionario obtenidos, no superan el 30% de blastocistos. Sin embargo, los COCs recuperados por OPU son aquellas provenientes de una única onda folicular en fase de crecimiento o estática, razón por la cual las tasas de desarrollo embrionario hasta blastocistos son superiores al 30% (Trasorras et al.,2012 y 2017).

## **1.2. Formulación del problema**

¿Cuál es la capacidad meiótica de complejo ovocitos cúmulus (COCs) recuperados mediante la técnica de *Ovum pick up* en alpacas (*Vicugna pacos*) y los complejo ovocitos cúmulus (COCs) provenientes de ovarios obtenidos post mortem?

## **1.3. Objetivos**

### **1.3.1. Objetivo General**

Evaluar la capacidad meiótica de complejo ovocitos cúmulus (COCs) recuperados mediante la técnica de *Ovum pick up* en alpacas (*Vicugna pacos*) y los complejo ovocitos cúmulus (COCs) provenientes de ovarios obtenidos post mortem.

### **1.3.2. Objetivos Específicos**

- Evaluar la calidad del complejo ovocitos cúmulus (COCs) recuperados por *Ovum pick up* (OPU), en alpacas (*Vicugna pacos*).
- Evaluar la calidad del complejo ovocitos cúmulus (COCs) recuperados de ovarios obtenidos post mortem, en alpacas (*Vicugna pacos*).
- Evaluar la capacidad de desarrollo embrionario del complejo ovocitos cúmulus (COCs) recuperados por *Ovum pick up* (OPU), en alpacas (*Vicugna pacos*).
- Evaluar la capacidad de desarrollo embrionario del complejo ovocitos cúmulus (COCs) recuperados de ovarios obtenidos post mortem, en alpacas (*Vicugna pacos*).

#### 1.4. Justificación

Los camélidos sudamericanos están compuestos por dos especies domésticas: llama (*Lama glama*) y alpaca (*vicugna pacos*) y dos especies silvestres: guanaco (*Lama guanicoe*) y vicuña (*vicugna vicugna*). Las poblaciones de camélidos sudamericanos (CSA) en América del Sur se encuentran en Perú, Bolivia, Argentina, Chile y Ecuador, con una población total cercana a los 9 millones de animales.

La producción de CSA es muy importante ya que se obtienen productos como carne, cuero y fibra, ésta última es el de mayor demanda comercial debido a su gran finura para la elaboración de prendas de vestir y demás.

Por otro lado, los productos cárnicos de los CSA poseen características peculiares como: excelentes propiedades nutricionales, bajo colesterol y elevados niveles de proteínas (Cristofanelli, Antonini, Torres, Polidori y Renieri, 2004 y Salvá Zumalacárregui, Figueira, Osorio y Mateo, 2009). Estas características han causado un aumento de la demanda mundial de los productos provenientes de la faena de alpacas y llamas. En Bolivia, Chile, Perú y norte de Argentina la carne de alpaca y llamas es consumida en forma fresca o conservada. A su vez, representa casi la única fuente de proteínas de elevado valor biológico de las comunidades andinas, debido a que estas especies pueden utilizar extensas áreas de praderas naturales que no pueden ser aprovechados de manera eficiente por otras especies domésticas.

En ese sentido la aplicación de Tecnologías Reproductivas (TR) como la *Ovum pick up* (OPU), fecundación *in vitro* (FIV), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), etc., permiten incrementar en un momento determinado el número de animales de alto valor genético, facilitando así el cruzamiento dirigido de hembras con cualidades genéticas deseables con machos reproductores de elite. Por lo tanto, la OPU puede ser aplicada para obtener ovocitos de hembras jóvenes con la finalidad de aprovechar al máximo el material genético (Galli et al., 2001 y Boni, 2012) ya que estas hembras en forma natural pueden tener hasta un máximo de 5 crías en toda su vida reproductiva (Ruiz, 2018).

En camélidos sudamericanos existen pocos reportes de producción *in vitro* de embriones con gametos provenientes de animales vivos, y se desconoce la calidad y capacidad meiótica de los ovocitos recuperados por el sistema OPU. La mayoría de los trabajos de FIV en CSA han sido realizados utilizando ovarios provenientes de camal.

Por otro lado, la calidad del ovocito es a menudo definida como la competencia de este para alcanzar el estadio del blastocisto dentro de un sistema de producción *in vitro* de embriones (Merton et al., 2003).

Numerosos reportes sugieren que la calidad intrínseca del ovocito es el factor crítico para determinar la proporción de ovocitos que desarrollarán hasta el estadio de blastocito (Lonergan et al., 2003). La competencia de desarrollo del ovocito es adquirida gradualmente y se incrementa con el desarrollo folicular así mismo está relacionado con el estatus fisiológico y reproductivo de las donadoras, el tamaño folicular y la integridad de las células del cúmulus (Lonergan, Monaghan , Rizos , Boland y Gordon, 1994 y Liebfried, 1996), condiciones de cultivo y métodos de colección de ovocitos (post mortem versus colección desde animales vivos). Se estima que aquellos COCs provenientes de ovarios obtenidos de camal son de calidad heterogénea y provienen de animales con diferentes estadios reproductivos y los resultados no son repetibles. Los COCs colectados por OPU son provenientes de folículos sin dominancia y no han sido sometidos a desarrollo preovulatorio final, como los COCs derivados de matadero y este hecho contribuiría a un mejor desarrollo embrionario a aquellos embriones provenientes de ovocitos recuperados de animales vivos.

### **1.5.Limitaciones**

- Escasos reportes de investigación en la recuperación de gametos por OPU en alpacas.
- Falta de movilidad propia para recolectar y transportar las muestras en menor tiempo del Camal Municipal hacia el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica lugar donde se ejecutó el trabajo de investigación.
- Falta de un ambiente adecuado que brinde un fácil acceso de animales de estudio y personal investigador, así como de fluido eléctrico para el uso de equipos como ecógrafo y sistema OPU en condiciones de campo.

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes

##### 2.1.1. A nivel Internacional

Del Campo, Del Campo C, Donoso, Berland y Mapletoft (1994) realizaron la investigación: *Fertilización in vitro y desarrollo de ovocitos de llamas (Lama glama) utilizando espermatozoides de epidídimo en co-cultivo con células del oviducto*. El objetivo fue determinar la viabilidad de desarrollar sistemas de maduración, fertilización y cultivo *in vitro* utilizando ovocitos foliculares y espermatozoides epididimarios recolectados de llamas post mortem. Se inseminó un total de 721 ovocitos con  $2-3 \times 10^6$  espermatozoides epididimarios / ml en una gota de 50  $\mu$ l de medio FERT-TALP. Después de 18 h de inseminación *in vitro*, se colocaron 234 ovocitos en un co-cultivo de células epiteliales oviductales de llama (LLOEC) en TCM-199 durante 9 días, el 15.8% se convirtió en 2 a 16 células, el 5.6% en mórulas, el 6.0% en blastocistos tempranos / expandidos y el 4.7% en blastocistos de eclosión / eclosión. Los resultados indicaron que es posible un sistema de fertilización *in vitro* en la llama utilizando material de matadero y que los ovocitos de llama pueden fertilizarse en presencia de heparina y espermatozoides epididimarios.

Brogliatti et al., (2000) realizaron el primer reporte de la aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía en CSA, investigación titulada: *Recolección transvaginal y ultraestructura de ovocitos de llama (Lama glama) en Estados Unidos*, con el objetivo de evaluar un método de recuperación de COCs repetible y de fácil aplicación como la *Ovum pick up* (OPU) en llamas.

Obtuvieron 65% de COCs colectados en llamas no estimuladas (n=10) frente a un 52 % en llamas estimuladas (n=5) con FSH y eCG al tercer día, para la superestimulación de folículos ováricos. Sin embargo, en las llamas superestimuladas recuperaron un mayor número de COCs (9,0 vs. 3,1) y diámetro (7,7mm vs. 4,5mm) frente a las no estimuladas y obtuvieron 38.7, 12.9, 12.9 y 22.6 % versus 44.4, 20.0; 11.0 y 24.4% COCs de calidad I, II, III y IV en aquellas llamas no estimuladas y estimuladas respectivamente. Demostrando así la factibilidad de la técnica de recuperación de COCs por *Ovum pick up* en llamas.

Gomez, Ratto, Berland , Wolter y Adams (2002) en la investigación titulada: *Respuesta a la superestimulación y recolección de ovocitos en Alpacas*, reportaron la primera producción de embriones cruce alpaca-llama luego de la FIV heteróloga utilizando ovocitos de alpaca provenientes de ovarios de mataderos y espermatozoides de epidídimo de llama en co-cultivo con células de oviducto de bovino. Utilizaron una muestra pequeña de ovocitos (n=5) y luego de 6 días todos llegaron hasta el estadio de mórula, pero ninguno continuó con el desarrollo. Estos autores repitieron la producción de embriones alpaca-llama mediante FIV, pero utilizando ovocitos de hembras superestimuladas y obtuvieron el mismo estadio embrionario luego de 7 días de cultivo.

Ratto, Gomez, Berland y Adams (2007) en la investigación titulada: *Efecto de la sobreestimulación ovárica en la recolección y maduración de COC en alpacas en Canadá*, donde el objetivo fue de evaluar la respuesta ovárica a la superestimulación con 200 mg de FSH y 1200 UI de eCG en alpacas y obtuvieron 20.0 (7.5) y 27.0 (3.3) folículos >6mm por hembra para aquellas hembras tratadas con FSH y eCG respectivamente, sin evidenciar diferencias estadísticas significativas entre ambos tratamientos. Con respecto a la tasa de recuperación de COCs por OPU en alpacas, reportaron 89 % (105/118) y 87% (163/187) de COCS recuperados en aquellas hembras tratadas con FSH y eCG respectivamente, sin evidenciar diferencias estadísticas significativas. Por otro lado, el número de folículos aspirados frente a los detectados fue del 100% [ (20.0/ 29.5) y (27.0/26.7)] tanto en aquellas hembras tratadas con FSH y eCG.

Los tratamientos con FSH y eCG fueron igualmente efectivos para la sobreestimulación ovárica y la recolección de ovocitos.

Berland et al., (2011) en la investigación titulada: *Fertilización in vitro y desarrollo de ovocitos cúmulos complejos recogidos por folículo guiado por ultrasonido aspiración en llamas superestimuladas en Chile*, con el objetivo de comparar la competencia de desarrollo de COCs colectados por aspiración folicular guiada por ultrasonografía (OPU) en llamas tratadas con FSH y eCG. Recuperaron  $11,5 \pm 1,9$  y  $9,7 \pm 1,2$  COCs en llamas superovuladas con FSH y eCG respectivamente. Los COCs expandidos provenientes de ambos tratamientos fueron fecundados *in vitro* utilizando espermatozoides epididimarios. Los gametos fueron co-incubados a  $39^{\circ}\text{C}$  con 5%  $\text{CO}_2$  por 18 horas. Después de la fecundación *in vitro*, los presuntos cigotos fueron incubados en medio SOF suplementado con 0,6% de albúmina de suero bovino (BSA) y co-cultivados con células de la granulosa de llama a  $39^{\circ}\text{C}$ , con 5 % de  $\text{CO}_2$ , y  $\text{O}_2$ , y 90 %  $\text{N}_2$  por 7 días. El porcentaje de cigotos que desarrollaron a 2-8 células en el día 2 fueron: 65,3 vs 63,1 %, mórulas en el día 5: 46,2 vs. 42,5 % y blastocistos en el día 7 fueron: 23,1 vs 20,5 % respectivamente para llamas tratadas con FSH y eCG y no evidenciaron diferencias estadísticas significativas ( $P>0,05$ ) entre ambos tratamientos. Quienes concluyeron que los COCs expandidos recuperados con FSH o eCG pueden ser utilizados directamente para la fecundación *in vitro*. Además, que su competencia no fue afectada por el tratamiento con gonadotropinas.

Trasorras et al. (2014) en la investigación titulada: *Primera preñez de llama (Lama glama) obtenido después de la fertilización in vitro y el cultivo in vitro de gametos de animales vivos en Argentina*, quienes presentaron el primer informe de preñez en la llama después de la transferencia intrauterina de embriones producidos por fertilización *in vitro* usando gametos de animales vivos, donde el objetivo fue evaluar la competencia de desarrollo y la tasa de preñez de los blastocistos eclosionados por llama producidos *in vitro* usando gametos de animales vivos y dos condiciones de cultivo diferentes. Quince hembras adultas fueron superestimuladas con 1500 UI de eCG, once (73%) respondieron al tratamiento y fueron utilizadas como donantes de ovocitos. Realizaron la aspiración folicular mediante laparotomía de flanco y las colecciones de semen, realizaron bajo

anestesia general por electroeyaculación del macho. Recuperaron 66 COCs de 77 folículos aspirados (recuperación del 86%), donde evaluaron dos sistemas de cultivo en microgotas [(CC1 (sin cambio de medio) y CC2 (con cambio de medio cada 48 horas)] y después de 24 horas de FIV obtuvieron 80 y 58% de blastocistos eclosionados y seguidos de la transferencia de 7 embriones eclosionados obtuvieron una preñez FIV de 23 días detectado por ultrasonografía transrectal.

### **2.1.2. A nivel Nacional**

Huanca et al., (2006) en la investigación titulada: *Recuperación de ovocitos vía transvaginal en Junin*, con el objetivo de recuperar ovocitos de alpacas vía transvaginal guiado por ultrasonido, recuperaron 4.5 folículos ováricos/alpacas mayores a 6 mm y lograron una tasa de recuperación de 55.5% COCs/alpaca posterior al tratamiento de superestimulación con 200 mg de FSH divididos en una aplicación dos veces/día durante 4 días consecutivos y la aspiración de los folículos fue realizada al sexto día. Los resultados evidenciaron que, es posible la recuperación de COCs en alpacas utilizando la aspiración transvaginal guiada por ultrasonografía. Asimismo, los diferentes resultados de recuperación de COCs por esta técnica obtenidos tanto en alpacas como en llamas puede estar influenciado por la experiencia del operario.

Fernández et al. (2015) en la investigación titulada: *Efecto de dos Métodos de colección sobre la cantidad y calidad ovocitaria de Alpacas (Vicugna pacos) y Llamas (Lama glama) post mortem en Puno*, donde el objetivo de estudio fue evaluar la cantidad y calidad de ovocitos obtenidos por dos métodos de ovarios de alpacas y llamas, utilizaron 40 ovarios de alpacas y 40 de llamas. Evaluaron dos métodos de colección de gametos (aspiración de folículos ováricos y corte de ovarios) en alpacas post mortem y obtuvieron 62 y 100 % de COCs colectados por aspiración manual folículos y corte de ovarios respectivamente.

Evaluaron la influencia de dos métodos de colección (aspiración y corte) sobre la calidad ovocitaria de alpacas y registraron 40 %, 31%, 8%, 20% y 30%, 31%, 23 %, 15.5% de COCs de calidad I, II, III, IV para el grupo de COCs recuperados por aspiración y corte respectivamente. Sin mostrar diferencias estadísticas significativas ( $P > 0.05$ ). En conclusión, la mayor cantidad de ovocitos recuperados fue por el método de corte que por aspiración folicular y con respecto a la calidad no encontraron el efecto del método sobre la categoría de los ovocitos.

Gamarra et al., (2007) en la investigación titulada: *Técnicas de recolección de ovocitos Ovum pick up en alpacas tratadas con gonadotropina en Junín*, donde el objetivo fue evaluar la cantidad y calidad de los ovocitos, usaron dos métodos de recolección de ovocitos y 2 maneras de estimulación ovárica en donantes de alpacas vivas. Usaron 34 alpacas, se distribuyeron aleatoriamente 4 grupos experimentales. Los grupos 1 ( $n = 8$ ) y 3 ( $n = 9$ ) recibieron un dispositivo intravaginal que contenía 0,78 mg de progesterona más una inyección intramuscular (IM) de 1 mg de benzoato de estradiol en el día 0; el dispositivo intravaginal se retiró el día 7. Los grupos 2 ( $n = 7$ ) y 4 ( $n = 10$ ) recibieron una inyección IM de 3.1 mg de LH en el día 0. Las hembras recibieron 700 UI de eCG IM el día 7 (grupos 1 y 3) o el día 2 (grupos 2 y 4). En todos los grupos, la recolección de ovocitos se realizó 2 días después de la inyección de eCG. La aspiración folicular para los grupos 1 y 2 fue vía laparotomía ventral y para los grupos 3 y 4 fueron vía transvaginal utilizando un ultrasonido. No hubo diferencias ( $P > 0.05$ ) entre los grupos, el promedio de folículos aspirados por donante (11.0, 13.8, 9.4 y 9.1 para los Grupos 1 a 4 respectivamente), y el promedio de COCs recuperados por donante (7.6, 7.0, 6.0 y 6.1 respectivamente para los Grupos 1 a 4). Las proporciones de COC de buena calidad fueron significativamente diferentes ( $P < 0.01$ ) entre los métodos de recolección quirúrgicos (81.0 y 79.5% para los Grupos 1 y 2) y transvaginales/guidados por ultrasonido (7.4% para el Grupo 3); sin embargo, fueron similares a la proporción en las recuperaciones del Grupo 4 (64,9%). Los resultados indicaron que, en ausencia de un dispositivo intravaginal, se puede recolectar una cantidad y calidad por ambos métodos de recolección.

### 2.1.3. A nivel regional

Ruiz et al., (2017) en la investigación titulada: *Efecto del tiempo de maduración de los ovocitos, el método de selección de espermatozoides y la tensión de oxígeno en el desarrollo embrionario in vitro en alpacas en Huancavelica*, donde el objetivo fue evaluar el efecto del tiempo de maduración in vitro, la selección de espermatozoides y la tensión de oxígeno en el desarrollo del embrión de alpaca. En el Experimento I, se obtuvieron complejos de ovocito cúmulo (COCs) de ovarios de matadero y se maduraron *in vitro* durante 24 (n = 217), 28 (215) o 32 h (223) a 38,5°C, alta humedad y 5% de CO<sub>2</sub> en el aire. Los ovocitos de 24 (n = 392), 28 (n = 456) o 32 (n = 368) h grupos fueron fertilizados *in vitro* con espermatozoides epididimarios y cultivados en SOFaa a 38.5 ° C, alta humedad y 5% de CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 90% de N<sub>2</sub> por 7 días). En el Experimento II, se usó un diseño factorial 2 por 2 para determinar el efecto de la selección de espermatozoides (Swim-up vs Percoll) y la tensión de oxígeno (20% vs 5%) durante el cultivo embrionario y su interacción en el desarrollo embrionario. Se asignaron un total de 235, 235, 253 y 240 ovocitos a: Swim-up + 20O<sub>2</sub>, Swim-up + 5O<sub>2</sub> o Percoll + 20 O<sub>2</sub>, Percoll + 5 O<sub>2</sub>, grupos respectivamente. Evaluaron el desarrollo embrionario a los 2, 5 y 7 de cultivo *in vitro* (día 0 = fertilización *in vitro*), obtuvieron 59, 41, 23 y 22% de clivaje, mórula y blastocistos respectivamente, después de la FIV de ovocitos madurados *in vitro* por un periodo de 24 horas, donde concluyeron que, no se vio afectado el método de selección de espermatozoides, la tensión de oxígeno o su interacción.

## **2.2. Bases Teóricas**

### **2.2.1. Fisiología ovárica**

#### **2.2.1.1. Ovogénesis**

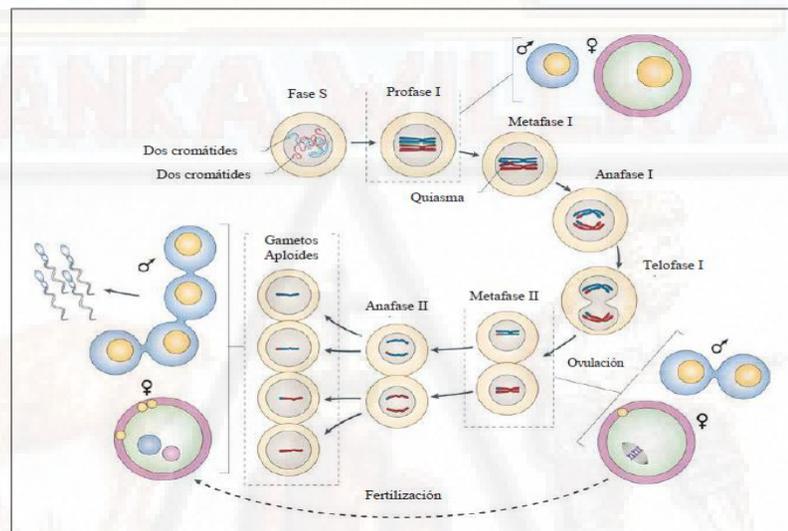
La ovogénesis es un proceso complejo, regulado por un gran número de factores intra y extra ováricos, desde células germinales hasta ovocitos fertilizables. Las oogonias, que se originan de células germinales primordiales, proliferan por mitosis y forman los ovocitos primarios que son arrestados en el estado de profase de la primera división meiótica. Dentro de los ovocitos primarios, la síntesis y acumulación de ácidos ribonucleicos (ARNs) y proteínas a través de ovogénesis son esenciales para el crecimiento y maduración del ovocito, y, además, crucial para el desarrollo interno del embrión después de la fertilización. (Hillier, Smitzy Eichenlaub, 2010; Sánchez y Smitz, 2012).

##### *A. Diferenciación celular en etapa fetal*

Los ovocitos se originan a partir de células germinales primordiales en el mesodermo extra-embriónico, cuyo desarrollo depende inicialmente de señales derivadas tanto del ectodermo extra-embriónico como del endodermo visceral. Migración, proliferación y colonización de las células germinales primordiales a las gónadas en desarrollo son controlados por muchos factores y dependerá también de la interacción de células germinales primordiales y sus células somáticas circundantes (Sánchez y Smitz, 2012). Las células germinales de mamíferos no determinan su destino sexual en función de su constitución cromosómica XX o XY. Su destino sexual es dependiente del medio ambiente gonadal en el que se desarrollan. En un testículo fetal, las células germinales se comprometen a un programa de desarrollo espermatogénico durante la vida fetal, a pesar de que no entran en la meiosis hasta la pubertad. En un ovario fetal, las células germinales se comprometen a ovogénesis entrando en profase de la meiosis I (Bowles y Koopman, 2010).

### B. Multiplicación celular

Después de colonizar la gónada, las células germinales primordiales pasan por una fase de proliferación mitótica con una citocinesis incompleta, que lleva a la formación de “nidos de células germinales”. Las ovogonias de los nidos de células germinales, están conectados por puentes intercelulares que forman grupos celulares o cordones corticales. Después de este evento y antes de la formación del folículo para divisiones mitóticas, las células germinales inician la meiosis y se convierten en ovocitos primarios (Sawyer et al.,2002 y Pepling, 2006).

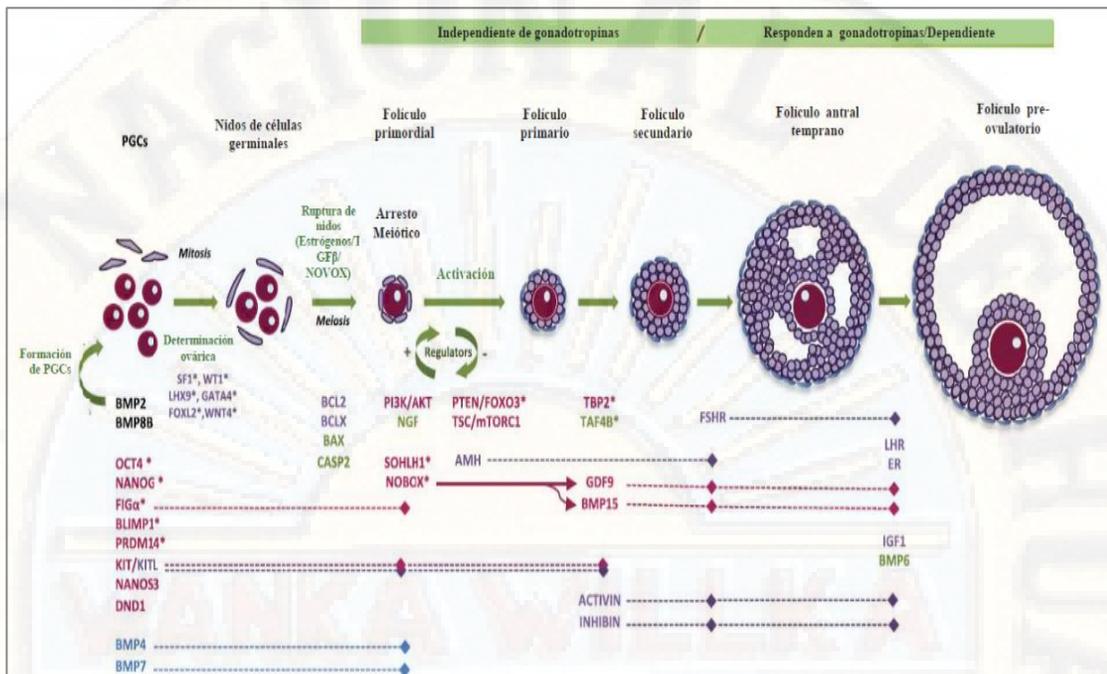


**Figura 1.** Diagrama de meiosis en mamíferos (Handel y Schimenti,2010)

La meiosis se inicia en un estado de profase, una compleja fase que es subdividida en cinco estados: leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis. Dentro del primer periodo de la profase una serie de eventos cruciales ocurren, involucrando el apareamiento de cromosomas homólogos, sinapsis (estrecha relación entre estos cromosomas), y recombinación o “Crossing over” (intercambio de material genético). Subsecuentemente, los ovocitos progresan al estado de diploteno e ingresan dentro de una prolongada fase restante llamada dictioteno (Hunt y Hassold, 2008).

### 2.2.1.2. Foliculogénesis

El folículo es la unidad estructural y funcional de los ovarios. La foliculogénesis se define como el proceso de formación, crecimiento y diferenciación folicular, abarca desde el estadio de folículo primordial hasta el de folículo pre-ovulatorio (Gigli, Russo y Agüero, 2006). El desarrollo folicular, a lo largo de sus etapas más tempranas ha sido considerado ser gonadotropina independiente y esencialmente impulsado por los factores de secreción local (Figura 2). Cuando los folículos alcanzan la etapa pre-antral, su desarrollo a lo largo de este periodo y progresión a la etapa antral temprana aún dependen principalmente de factores intra-ováricos; sin embargo, a diferencia de las etapas anteriores, los folículos expresan respuesta FSH funcional y receptores de LH y son capaces de responder a las gonadotropinas, como se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* (Sánchez y Smitz, 2012). El desarrollo de folículo primordial a folículo pre-antral básicamente involucra crecimiento celular, proliferación y diferenciación (Braw-Tal, 2002). La formación de una cavidad llena de fluido, el antro, dentro de una granulosa de varias capas, es característico de folículos antrales. En el folículo antral existen dos poblaciones específicas de células de la granulosa: (1) células de la granulosa del cúmulus, organizados como un epitelio pseudo-estratificado que encierra el ovocito, y (2) células de la granulosa mural que comprende las capas internas de la pared del folículo y la formación de un epitelio pseudo-estratificado en contacto con la lámina basal, que es adyacente a la teca externa. Por último, en respuesta a la estimulación hormonal, dos eventos importantes se producen en el complejo celular ovocito-cúmulus: (1) los ovocitos al completar su crecimiento completan la primera división meiótica y se detienen en metafase II, y (2) las células de la granulosa del cúmulus que rodean a las células germinales (ovocitos) se someten a expansión o mucificación, que consiste en la deposición de una matriz extracelular rica en ácido hialurónico que hace que las células se separen. Por último, el ovocito en metafase II, aún encerrado por las células del cúmulus expandido, es ovulado en el oviducto listo para la fertilización (Buccione, Schroeder y Eppig, 1990)

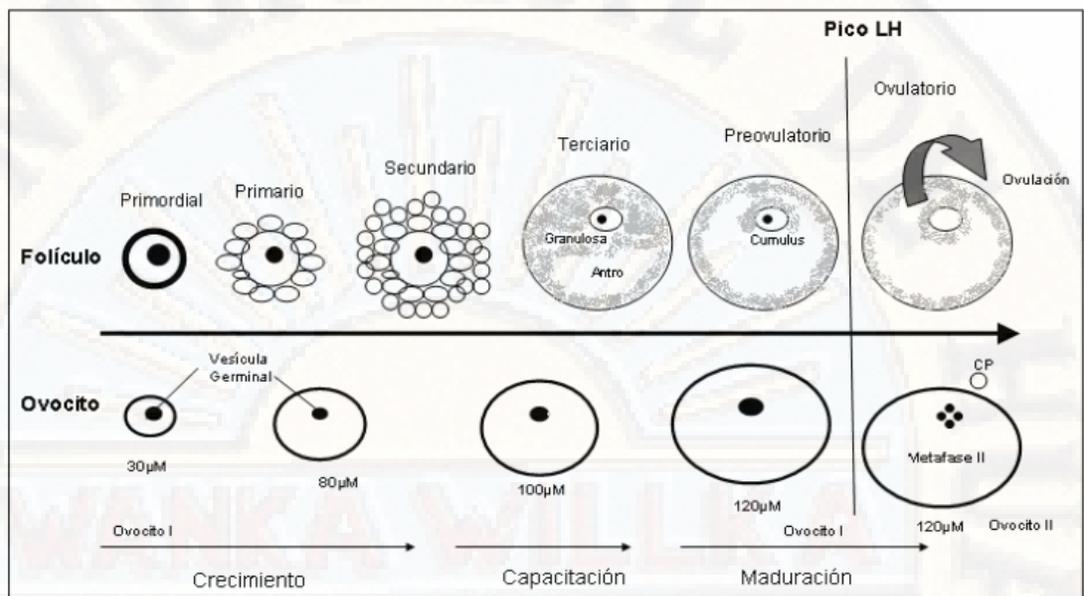


**Figura 2.** Representación de los factores que intervienen en formación de células germinales primordiales (PGC), la ovogénesis y foliculogénesis. Factores ováricos producidos por las células/estroma teca (en azul), las células somáticas/granulosa (en morado), las células germinales (en rojo) o en ambas células germinales y células de la granulosa (verde), ovocitos participan y regulan el desarrollo de los folículos en cada una de las etapas definidas en toda la foliculogénesis. Los factores de transcripción implicados se indican con un asterisco (\*). Las proteínas del ectodermo extra embrionario que participan en la formación de PGC se indican en negro (Sánchez y Smitz, 2012).

### 2.2.2. Maduración del ovocito

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

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



**Figura 3.** Fases del crecimiento, capacitación y maduración durante la foliculogénesis del ovocito (Mermillod, Oussaid y Cognie, 1999).

#### A. 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 germinativa involucra la condensación de la cromatina en pares, con pérdida de nucléolos y membrana nuclear, ocurriendo la díacinesis 16 horas después de haber iniciado el cultivo de ovocitos en porcinos, de 5 a 6 horas en bovinos y de 3 horas en conejas (Thibault, 1977).

Sato, Iritani y Nishikawa (1982) observaron la metafase II 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 (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.

#### *B. Maduración de la zona pelúcida (ZP)*

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

#### *C. Maduración citoplasmática*

La inducción de la maduración citoplasmática requiere de esteroides, síntesis de proteínas intrafolliculares 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 et al., 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.

### **2.2.3. Técnicas de recuperación de Complejos Ovocito Cúmulus (COCs)**

Existen varias técnicas de recuperación de ovocitos de las cuales nos permite recuperar COCs usando folículos no ovulatorios, que bajo condiciones fisiológicas normales se tornarían en folículos atrésicos lo cual es de mucha importancia para lograr el máximo aprovechamiento del potencial genético de una donadora mediante procedimientos *in vitro* (Gordon y Lu, 1990).

### **2.2.3.1. Aspiración folicular del COCs de ovarios obtenidos post mortem**

Existen varios métodos de obtención de ovocitos, el más sencillo es obtener de los ovarios después del beneficio de los animales, por medio de la aspiración de los folículos con una aguja y/o bomba de succión. Este método tiene la ventaja del reducido costo de obtención en relación a los que emplean aparatos eléctricos o electrónicos (Palma, 2001). Sin embargo, no se conoce si estos folículos recuperados, considerados pre ovulatorios, están en fase de crecimiento o regresión, lo que afectaría la calidad de los ovocitos (Trasorras, Giuliano y Miragaya, 2013). Normalmente, los ovocitos que se utilizan en los procesos de maduración *in vitro* (MIV) y fertilización *in vitro* (FIV), son obtenidos de los ovarios de los animales que son sacrificados para consumo, lo cual viene a ser una fuente económica que permite la recuperación de gran número de ellos (Bols, Van, Ysebaert, Vyeneheede y Knrit, 1996). 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).

Cuando los ovarios llegan al laboratorio son lavados con solución salina, suero fisiológico, alcohol y antibióticos (Gonella, Atuesta, Bernal y Chacón, 2013).

La obtención de los ovocitos por aspiración de los folículos antrales es la técnica más empleada en la recuperación ovocitaria en ovarios de matadero; sin embargo, se sabe que de todos los folículos puncionados sólo se recupera el 30 o 60% de ovocitos. La ventaja de la absorción folicular se basa en la velocidad y la facilidad operacional, factor particularmente importante en una unidad comercial de producción de embriones. La aspiración folicular se le puede realizar con agujas de 18 a 22 g empataadas en jeringas de 3 o 10ml (Gonella y col., 2013)

Para la recuperación de COCs en hembras de camélidos sudamericanos. Se han evaluado diferentes metodologías: 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 MIV y FIV, y para su utilización como receptores de núcleo de células donadoras en un programa de transferencia nuclear (Ruiz y Correa, 2007)

### **2.2.3.2. Aspiración folicular de ovocitos de donantes vivas**

Otra forma de obtención de ovocitos es de animales vivos, a través de la punción folicular utilizando la técnica de *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, Kappen, Kruip y Taverne, 1998). 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 OPU y laparoscopia (Ruiz y Correa, 2007).

#### *A. Ovum pick up (OPU)*

La técnica de la aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonido para la recuperación de COCs, denominada OPU fue desarrollado originalmente para la reproducción asistida en humanos y posteriormente se utiliza en el ganado bovino en los Países Bajos a finales de 1980 (Chaubal et al., 2006 y Oikawa, Itahashi y Numabe, 2016).

Un sistema de OPU está compuesto por un ecógrafo con transductor, una bomba de aspiración y una aguja, además posee un sistema de guía que es conectado a un tubo colector y una sonda cuyo diseño posibilita la manipulación de la aguja de punción desde el exterior, así como poder visualizar durante la punción de folículos ubicados cerca al transductor (Corredor y Páez, 2012).

La técnica de aspiración folicular mediante OPU es una técnica que consiste en realizar ubicando la cabeza del transductor caudal al cérvix y al ovario a puncionar y se coloca a la derecha o a la izquierda. El dispositivo se manipula desde el exterior de la hembra con una mano mientras que la otra mano es introducida en el recto para fijar el ovario contra el transductor visualizándose el ovario y los folículos en la imagen ecográfica, una vez fijado el ovario, la aguja es visualizada en el sector y con movimientos suaves y cuidadosos es perforada la pared vaginal y los folículos son puncionados de esta manera, donde el líquido folicular es aspirado con una bomba de vacío y recolectados en un tubo colector conteniendo un buffer fosfato salino (PBS) (Corredor y Páez, 2012).

#### 2.2.4. Producción *in vitro* de embriones (PIV)

La producción *in vitro* de embriones representa una biotecnología de gran trascendencia productiva para el mejoramiento genético de animales élite como también para preservar especies de interés, es una alternativa que utilizando de por medio la técnica de FIV se busca obtener altas tasas de embriones. La producción de embriones *in vitro* de animales de granja pasa por las etapas de maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos, fertilización *in vitro* (FIV) de ovocitos madurados, y cultivo *in vitro* (CIV) de embriones.

##### 2.2.4.1. Maduración *in vitro* (MIV)

###### A. Selección de ovocitos para MIV

La selección de los Complejos Ovocito-Cúmulo (COCs) para maduración *in vitro* de ovocitos, se clasifican de acuerdo a la compactación de cúmulo y su aspecto citoplasmático, según los criterios de (Ratto y col., 2005).

**Tabla 1** Clasificación del Complejo Ovocito-Cúmulo (COCs) de Alpaca.

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

Fuente: Ratto y col., (2005)

###### B. 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 ocurra la ovulación (Ruiz y Correa, 2007).

En la maduración de los ovocitos, se reactiva la división 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 partenogénicos, por inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), por clonación o por transgénesis.

Muy pocos estudios han sido conducidos sobre la maduración *in vitro* de ovocitos en camélidos sudamericanos, sin embargo, existe gran interés de diversos grupos investigadores en diferentes partes del mundo en describir el desarrollo de la producción *in vitro* de embriones siendo una de las principales limitantes el desconocimiento del tiempo de maduración y fertilización de ovocitos (Del Campo et al., 1994).

Para la maduración *in vitro* de ovocitos, se utilizan medios de cultivo clasificados en medios simples y complejos (Gordon, 2003). 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 Cultures 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).

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

La FIV 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 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 COCs ya sea de los ovarios de matadero o animales vivos. Cuando este es el caso, los animales son sometidos a un tratamiento superovulatorio previo. Los ovocitos son colectados mediante aspiración folicular de folículos antrales de 2-6mm de diámetro. Estos folículos se caracterizan por contener altos niveles de testosterona y bajos niveles de progesterona y estradiol en el fluido (Cupps, 1987). Se seleccionan los ovocitos aptos para la maduración y se transfieren a un medio de cultivo enriquecido con suero y hormonas por 24-25h (Bearden y Fuquay, 1997).

#### *A. Recuperación de espermatozoides del epidídimo*

La técnica consiste en la separación quirúrgica de las colas epididimarias del testículo para luego extraer los espermatozoides que llevan en su interior usando como medio una solución fisiológica buferada (PBS), obteniendo finalmente una suspensión de espermatozoides que se toma como muestra. Esta técnica está orientada principalmente al rescate del germoplasma de individuos muertos súbitamente, cuyas especies se encuentren en peligro de extinción y cuyas colectas de semen sean difíciles de realizar (Anel et al., 2002); no obstante, la recuperación de espermatozoides epididimarios también se constituye en una herramienta factible de usarla con machos sin valor genético y/o económico como modelos para experimentar diversos efectos en las respuestas biológicas y fisiológicas de los espermatozoides. En camélidos domésticos se recuperan espermatozoides epididimarios para ensayo de FIV y estandarizar protocolos para pruebas de fertilidad en machos (Ratto, Wolter, Gomez, Berland y Adams, 1999 y Santiani, 2012).

#### *B. Elección de espermatozoides vivos*

Al menos dos metodologías han sido descritas para el lavado de las células espermáticas y su selección en Camélidos Sudamericanos. Estas son: Swin-up y gradiente de percoll (Mendoza et al., 2008).

El método de Swim-up separa los espermatozoides móviles de los no móviles. De este modo, una muestra de semen colocada en el fondo de un tubo que contiene medio de cultivo a 37°C, permitirá después de un tiempo de cultivo, que los espermatozoides móviles se desplacen hacia la superficie del tubo (Parrish et al., 1986).

Un estudio realizado por (Mendoza et al., 2008) comparó estas dos técnicas, gradiente de Percoll y Swim-up, para utilizar en la FIV de ovocitos de alpaca. Los resultados mostraron que, si bien los medios utilizados en las dos técnicas difieren entre sí, la separación por Swim-up fue más efectiva que la de gradiente de percoll. Una vez que los espermatozoides han sido lavados, seleccionados y capacitados, se realiza el co-cultivo de estos con los ovocitos madurados *in vitro*.

#### **2.2.4.3. Cultivo *in vitro* de embriones**

Para el cultivo de cigotos y su posterior desarrollo *in vitro* se utilizan generalmente medios definidos como: Fluido de Oviducto Sintético (SOF), Fluido de Oviducto Sintético Modificado (SOFM); Charles Rosenkrans (CR1), Chatot Ziomek Bavister (CZB) y Medio Optimizado Simple de Potasio (KSOM). Estos medios eliminan la variabilidad de los resultados, las utilidades extras de subproductos de origen animal tienden a simplificar los sistemas de cultivo (Santayana, 2011). Sin embargo, el que más se utiliza en la producción *in vitro* de embriones en diferentes especies es el medio SOF, que se caracteriza por ser un medio con bajos niveles de Sodio y altos niveles de Potasio, comparados con los niveles plasmáticos. Estos dos elementos son cuidadosamente balanceados al formular los medios de cultivo, así como: el magnesio, calcio, bicarbonato, sulfatos y fosfatos. La composición iónica, el pH, la osmolaridad y el contenido macromolecular contenidas en el líquido oviductual difieren enormemente de los del plasma sanguíneo. Esta generalmente aceptado que el cloruro sódico es necesario para regular la osmolaridad del medio de cultivo y que el calcio y el potasio son esenciales para el desarrollo embrionario. La ausencia de calcio en el medio de cultivo resulta en una reducción de las divisiones embrionarias y una incapacidad para la compactación de las mórulas superficie (Contreras, 2014).

##### **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 la mitosis de las células somáticas.

El estadio de mórula (8-16 células) en la especie porcina se alcanza alrededor del día 4 posterior al servicio (Hunter, 1990) y en la alpaca a los 4 y 5 días post FIV (Ruiz et al., 2017). 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 estos se asocian a un incremento en el número de ribosomas. (Ratto et al., 2005)

#### *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 del 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 formara posteriormente el corion (Hafez, 2000).

### 2.3. Bases conceptuales

- **Alpaca.** - La alpaca, miembro del orden *Artiodactyla* y de la familia *Camelidae*, es distintiva por tratarse de la especie de camélido sudamericano más numerosa y pequeña. Presenta almohadillas plantares, característica que le otorga la condición de animal ecológico al no dañar el pasto ni provocar erosión. Los índices técnicos de la crianza de alpacas son: 45% de natalidad, 30% en mortalidad en crías, 10% en mortalidad en adultos, 12% de saca, 50-70 kg. de peso adulto, 54% de rendimiento de carcasa, y 1,6% de peso de vellón (CONACS, 2005).
- **Desarrollo folicular.** - En general el desarrollo folicular es una sucesión de folículos presentes en ambos ovarios y de varios tamaños; sin embargo, la sucesión está dada por la presencia de un folículo dominante. Estas ondas foliculares no son interrumpidas por una fase luteal si la hembra no es empadrada. Un estudio más detallado de las ondas foliculares indica la ocurrencia de tres fases: crecimiento, maduración y regresión. (Sansinena, 2007 y Mehlmann, Jones y Jaffe, 2002)
- **Ovulación.** - Las hembras de los camélidos sudamericanos son clasificados como de ovulación inducida. El estímulo ovulatorio natural es la copula por el macho, pero también una hembra puede ovular después de la administración de hormonas con acción luteinizante; sin embargo, no todas las hembras ovulan después de la monta. Esto se debe primero a que no existe correlación entre el tamaño folicular y la receptividad sexual. La hembra acepta al macho independientemente del tamaño folicular, además la descarga preovulatoria de LH de la pituitaria ocurre solamente cuando el folículo tiene como mínimo 7mm y lo que constituye un folículo, entonces un folículo es de 7 a 12mm. (Buccione, Schroeder y Eppig, 1990 y Hunter, 2000).
- **Fase luteal del ciclo ovárico.** - Luego de la ovulación, las células de la capa granulosa invaden el espacio vacío dejado por el líquido folicular, se reorganizan y se diferencian para la secreción de progesterona. Esto da lugar a un cuerpo lúteo

(CL) funcional que puede ser detectado por laparoscopia, ecografía y concentraciones de progesterona (Apa et al., 1994 y Xia, Tekpetey y Armstrong, 1994) antes del establecimiento del cuerpo hemorrágico simplemente por la extravasación de componentes de la sangre debido a la ruptura del folículo. Un CL crece rápidamente y alcanza su tamaño máximo a los 8- 9 días después de la copula, y ese tamaño es 13 a 15mm dependiendo de la especie.

Luego en el caso de que no exista concepción regresiona y se convierte en un cuerpo albicans dejando de secretar progesterona. En cambio, si hubo concepción y la hembra permanece preñada el CL se mantiene funcional hasta el término de la preñez, es decir, 11.5 meses.

- **Sincronización hormonal de la onda folicular.** - La sincronización de la onda folicular en animales domésticos se logra generando una fase luteal artificial ya sea con la utilización de un progestágeno. (Martinez Adams, Kastelic, Bergfel y Mapletoft, 2000) o ablación mecánica (vacunos y Camélidos domésticos) (Ruiz, 2015) seguido de la emergencia de una nueva onda folicular y reclutamiento de folículos en todas las hembras sincronizadas
- **Inducción del crecimiento folicular.** - La inducción del crecimiento folicular es un requisito para programas de superovulación y transferencia de embriones. Los camélidos sudamericanos presentan dos eventos, primero un crecimiento folicular de más de dos folículos y luego la ovulación de esos folículos múltiples ya sea con el uso del macho o con hormonas de acción luteinizante. La fisiología ovárica de la hembra conduce al crecimiento de un solo folículo ovárico, y las hembras no experimentan por una fase luteal previa como existe en otros animales de granja (Ruiz, 2011).

#### 2.4. Definición de términos

- **Complejo Ovocito Cúmulos (COCs).** - Célula rodeada por la zona pelúcida (ZP), Ovocito y por varias capas de células de la granulosa (Lliteras y Chong, 2009).

- **Cuerpo lúteo.** - Tejido amarillo que se desarrolla a partir de un folículo ovárico después de que se ha liberado óvulo maduro. Produce progesterona, hormona que prepara el revestimiento del útero para recibir el óvulo fecundado. Si ocurre la fecundación, el cuerpo lúteo crece y continúa produciendo hormona de sostenimiento de la preñez durante varios meses. Si no ocurre la concepción, el cuerpo lúteo se degenera.
- **Folículo.** - El folículo es la unidad estructural y funcional de los ovarios
- **Gónadas.** - Glándulas sexuales primarias; ovarios o testículos.
- **Gonadotropina, hormona liberadora de (GnRH).** - Hormona deca péptida que se libera del hipotálamo, controla la síntesis y secreción de gonadotropinas y, en consecuencia, la capacidad de reproducción. Es el péptido que segrega las neuronas hipotalámicas en la circulación portal hipofisaria, e induce la secreción de la hipófisis (LH)/(FSH)
- **Meiosis.** - Proceso de división de reducción para producir gametos haploides, que consta de una sola duplicación del material genético
- **Mitosis.** - Reproducción de la célula para formar dos células hijas con grupos idénticos de cromosomas.
- **Mórula.** - Masa esférica maciza de células procedentes de la división del óvulo fertilizado en los primeros estadios del desarrollo embrionario.
- **Blastocisto.** - Es un embrión de 5 a 6 días de desarrollo que presenta una estructura celular compleja formada por aproximadamente 200 células.
- **Ovocito.** - Célula en el ovario que se deriva del oogonio, el cual, al pasar por la meiosis, produce un óvulo, óvulo primitivo en el ovario.
- **Ovum pick up (OPU).** - Es una tecnología que ofrece un método manejable de recuperación de ovocitos de ovarios de animales vivos por vía transvaginal guiado por ultrasonografía, ya para diferentes propósitos como: la FIV, criopreservación, ICSI, HMC, de los cuales se presume son de mejor calidad (homogéneos) y ofrecen buenos resultados de desarrollo embrionario posterior al cultivo *in vitro* (karadjole, Samardžija, Getz y Mačešić, 2010)

## 2.5. Variables

### 2.5.1. Variables independientes

Calidad de COCs recuperados por el sistema OPU y de ovarios obtenidos post mortem.

### 2.5.2. Variables dependientes

Capacidad meiótica de COCs recuperados por el sistema OPU y de ovarios obtenidos post mortem.

## 2.6. Operacionalización de variables

**Tabla 2** Operacionalización de variables

Variables	Dimensión	Indicadores	Escala
<b>Variable independiente</b> Calidad de COCs recuperados por el sistema OPU y de ovarios obtenidos post mortem.	Calidad de COCs	Calidad I Calidad II Calidad III Calidad IV	Ordinal
<b>Variable dependiente</b> Capacidad meiótica de COCs recuperados por el sistema OPU y de ovarios obtenidos post mortem.	División Mórula Blastocisto temprano Blastocisto eclosionado	% división % mórula % blastocisto	Númerica

## **CAPITULO III**

### **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **3.1. Ámbito temporal y espacial**

##### **3.1.1. Ámbito temporal**

El periodo que comprende la investigación, corresponde al periodo 2018-2019.

##### **3.1.2. Ámbito espacial**

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica, ubicado en el Distrito, Provincia y Región de Huancavelica, a 12° 47' 06'' de Latitud sur y a 74°58' 17'' de Longitud Norte, a una altitud de 3680 m.s.n.m., con temperatura media anual de 9°C. Los ovarios y testículos de alpaca fueron recuperados en el Camal Municipal de Huancavelica y trasladados al laboratorio.

#### **3.2. Tipo de investigación**

##### **Básica**

Está orientada a la búsqueda de nuevos conocimientos y nuevos campos de investigación sin un fin práctico específico e inmediato con la finalidad del desarrollo de la ciencia, el mismo que se puede alcanzar en la perspectiva de su comprensión, de su explicación o de su predicción (Arainga, 2011).

#### **3.3. Nivel de investigación**

##### **Explicativa**

Este tipo de estudio está dirigido a responder a las causas de los eventos físicos o sociales por lo que su principal interés es explicar por qué ocurre un fenómeno y en que condiciones se da este, de modo tal que pueda explicar cómo, cuánto, dónde y por qué ocurre un fenómeno (Arainga, 2011).

### **3.4. Población, muestra y muestreo**

#### **3.4.1. Población**

La población de estudio estuvo conformada por un total de 30 alpacas hembras (15 animales vivos procedentes del Centro de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos (CIDCS) y 15 animales beneficiados procedentes del Camal Municipal de Huancavelica)

#### **3.4.2. Muestra**

La muestra total fue de 56 ovarios de alpacas hembras procedentes de animales vivos y sacrificados, también se utilizaron 20 testículos de alpacas, muestras obtenidas del Camal Municipal de Huancavelica.

#### **3.4.3. Muestreo**

La muestra se tomó de manera no probabilística por conveniencia, donde la técnica de muestreo fue manipulada por el investigador para seleccionar las muestras basadas en un juicio subjetivo en lugar de hacer la selección al azar, en donde no todos los miembros de la población tienen la oportunidad de participar en el estudio (Sampieri, 2014).

#### **3.4.4. Unidad Experimental**

Ovarios de alpacas

### **3.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

#### **3.5.1. Técnicas de recolección de datos**

##### **A. Recuperación de COCS de ovarios obtenidos post mortem**

Los ovarios (n=30) se obtuvieron de 15 alpacas hembras sacrificadas en el camal Municipal de Huancavelica. Los ovarios fueron retirados del tracto reproductivo de las alpacas y transportados en un termo con solución fisiológica temperada a 35°C, posterior a las 2 horas de sacrificio de los animales. Los COCs fueron recuperados por punción de folículos ováricos con aguja de 21 G, de acuerdo a la descripción de et al., (2017). Donde se registraron la cantidad de estructuras foliculares y las cantidades de COCs recuperados por cada ovario.

## **B. Recuperación de COCs por sistema *Ovum pick up* (OPU)**

Las 15 alpacas donantes de COCs destinadas a los protocolos de OPU fueron trasladadas desde el Centro de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos (CIDCS) hasta las instalaciones del campus de la Universidad Nacional de Huancavelica, y fueron mantenidos en cuarentena por un periodo de 30 días. Seguidamente los animales fueron sometidos a protocolos de sincronización ovárica (día 0) que se detalla a continuación:

### *1. Sincronización ovárica (día 0)*

Un grupo de 15 alpacas hembras entre 3 a 4 años de edad mantenidos en confinamiento, fueron seleccionadas por ecografía, de los cuales 13 hembras vacías (no preñadas), con folículos ováricos mayores a 5 mm fueron seleccionadas para sincronización y sometidas a 1 ml de GnRh para inducir ovulación.

### *2. Tratamiento de superovulación ovárica con eCG*

Posterior al tratamiento con GnRh para la inducción de ovulación del folículo dominante un grupo de hembras con respuesta fueron sometidas a un protocolo de super estimulación ovárica con una única dosis de 200 U.I de Folligon intramuscular y 4 días después fueron sometidas a la aspiración folicular guiada por ultrasonografía.

### *3. Recuperación de COCs por OPU*

Los COCs recuperados mediante el sistema OPU siguieron la metodología de Huanca y col., (2006). Con algunas modificaciones donde las hembras superestimuladas con 12 horas de periodo de ayuno fueron tratadas con una dosis de 0.7 ml de tranquilizante (xilacina clorhidrato), dentro de los 15 minutos estas fueron inmovilizadas sobre una mesa de trabajo y previo a la evacuación del material fecal se procedió a desinfectar la región perianal y bulbar con agua y jabón, seguido de alcohol yodado. La respuesta ovárica de los tratamientos de superestimulación fueron evaluadas con un ecógrafo compuesto por un transductor transvaginal de 7.5 MHz, donde se registraron el número de estructuras foliculares. Para la recuperación de COCs, se utilizó aguja de 21G para OPU con bisel corto, el cual fue distribuido junto a los cristales de ultrasonido de una guía de colección que desemboca en un tubo

colector seguido de una guía de colección que desemboca en un tubo colector de 50 ml conteniendo PBS + EDTA al 0.1% a 37°C. Se utilizó un tubo colector para cada hembra debidamente rotulado y la búsqueda y categorización fueron realizados en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas dentro de los 15 minutos posteriores al OPU.

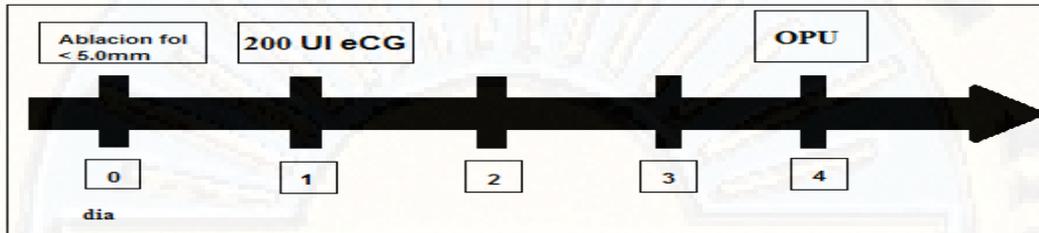


Figura 4. Protocolo de sincronización ovárica (Ratto y col., 2007).

### C. Clasificación y evaluación de COCs en el laboratorio

#### 1. Búsqueda y Clasificación de los COCs de ovarios obtenidos post mortem.

Las clasificaciones de los COCs obtenidos de ovarios del matadero fueron realizadas de acuerdo a Ratto et al., (2005). Donde los COCs de categoría I (excelentes), aquellas que presentaron citoplasma oscuro uniforme combinado con 5 o más capas compactas de células del cúmulus. Categoría II (buenos): con citoplasma oscuro uniforme conjuntamente con menos de 5 capas compactas de células del cúmulus. Categoría III (regulares) con un citoplasma menos uniforme, con distribución irregular de células del cúmulus y menos compactas y categoría IV (malos) con citoplasma heterogéneo, fragmentado y las células del cúmulus ausentes en su totalidad. La búsqueda de los COCs se realizó con estéreo microscopio con un aumento de 20x y platina térmica a 37°C.

#### 2. Búsqueda y Clasificación de los COCs obtenidos por sistema OPU

El líquido folicular recuperado de cada hembra fue transferido a un filtro Em-Com para lavado de embriones, donde los ovocitos fueron lavados con abundante medio PBS atemperado a 37°C, seguidamente transferidos a placas Petri estériles de 90x15mm para la búsqueda y clasificación. La búsqueda de los COCs se realizó con estéreo microscopio con un aumento de 20x y platina térmica a 37°C. la clasificación de los COCs fue realizadas de acuerdo a Ratto et al., (2005).

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

Luego de realizar la recuperación de COCs por ambas técnicas, los COCs fueron madurados, fecundados y cultivados *in vitro*.

### **1. Maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca**

Los COCs recuperados fueron sometidos a maduración *in vitro* en medio de maduración (TCM-199 modificado con Hepes) compuesto por sales Earles y suplementado con piruvato de sodio a una concentración de 0,2 mM, sulfato de gentamicina 50 µg/ml, FSH 0.02 unidades/ml, estradiol 17-β 1 µg/ml y SFB al 10%. Luego fueron transferidos a una placa Petri que contenía 2 ml de solución TCM-199 de maduración. Los COCs fueron cultivados a 38,5°C por un periodo de 26 horas en estufa de cultivo con una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> y 99% de humedad relativa descrito por (Ruiz et al., 2013).

### **2. Fecundación *in vitro***

Luego de 26 horas de maduración *in vitro* de ovocitos se utilizaron no menos de 178 ovocitos para la fertilización *in vitro*. Los ovocitos se colocaron en grupos de 10 pocillos de cultivo con 500 µl de medio Fert-Talp suplementado con piruvato de sodio al 0,2Mm, 50 µg/ml de sulfato de gentamicina y 6mg/ml BSA. Se utilizó una concentración final de espermatozoide de 30 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml con una motilidad superior a 80%. El tiempo de co-cultivo ovocito-espermatozoide fue de 18-20 horas.

### **3. Cultivo *in vitro* de embriones**

Posterior a las 20 horas de la FIV, los supuestos cigotos fueron pipeteadas suavemente para remover las células del cúmulus y a los espermatozoides que aún puedan encontrarse adheridos. Posteriormente fueron lavados en solución SOFm-Hepes y luego fueron transferidos en pocillos de 500 µl de medio de cultivo de embriones SOFm-IVC suplementando con 10% de SFB, 0,13% aminoácidos BME, 0,063% de aminoácido MEN, 1 mM de L-glutamina, 10% de insulina y 50µg/ml de gentamicina (Mellisho, Rivas, Ruiz, Mamani,2014).

Luego se cultivaron en una estufa de cultivo a 38,5 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y 99% de humedad relativa durante un periodo máximo de 8 días. En todos los casos se realizaron cambios de medio de cultivo de embriones cada 24 horas y se utilizaron SOFm-SFB suplementando con 2mM de glucosa (Landeo et al., 2017). Las tasas de desarrollo embrionario como: división, mórula y blastocistos tempranos, fueron evaluados a las 48, 96 y 144 horas después de la fecundación *in vitro*, las tasas de blastocistos expandidos, eclosionados y degenerados fueron evaluados a partir de los días 5 a 6 días posterior a la FIV.

#### **E. Evaluación del desarrollo embrionario**

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

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

- **División (día 2-4):** De 2 a 6 células.
- **Mórula (día 5):** El cigoto presenta aproximadamente entre 16 a 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.
- **Blastocisto temprano (día 5):** 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 (blastocele) en el interior del embrión, dando la apariencia de un anillo de sello. El blastocisto temprano ocupa 70-80% del espacio perivitelino. Es posible diferenciar el trofoblasto de la masa celular interna.
- **Blastocisto expandido (día 6):** Más de 200 células. El diámetro aumenta considerablemente, con el consecuente adelgazamiento de la zona pelúcida a un tercio de su espesor original. Los embriones que llegan a este estadio generalmente se degeneran por deshidratación.
- **Blastocisto protruido (día 6-7):** Aproximadamente entre 200 y 800 células. Los embriones han abandonado la zona pelúcida. Su forma puede ser esférica, con un blastocele bien definido o colapsado.

### **3.5.2. Instrumentos de recolección de datos**

#### *A. Recuperación, maduración de ovocitos seleccionados*

- Ficha para obtención de muestra.
- Ficha de recuperación, maduración de ovocitos

#### *B. Evaluación, Recuperación y Capacitación de los espermatozoides*

- Ficha de evaluación de viabilidad, motilidad y concentración de espermatozoides.

#### *C. FIV, Cultivo in vitro de Embriones*

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

### **3.6. Técnicas y procesamiento de análisis de datos**

Para el análisis de la cantidad de ovocitos recuperados y la capacidad meiótica de COCs recuperados por OPU y ovarios obtenidos post mortem se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con una comparación de medias de pares con una significancia de  $p < 0.05$ . Donde fueron puncionados 56 ovarios (26 por *ovum-pick up* y 30 por punción folicular con aguja).

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Infostat versión estudiantil 2008.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

#### 4.1. Análisis de información

**Tabla 3.** Número de folículos aspirados, COCs colectados y calidad de ovocitos colectados por *Ovum pick up* (OPU) y aspiración folicular de ovarios obtenidos post mortem.

Origen de COCs	N°	N° Folículos aspirados n ( $\bar{X} \pm D.E$ )	N° COCs Recuperados n ( $\bar{X} \pm D.E$ )	Calidad de COCs (%)			
				I	II	III	IV
				n ( $\bar{X} \pm D.E$ )	n ( $\bar{X} \pm D.E$ )	n ( $\bar{X} \pm D.E$ )	n ( $\bar{X} \pm D.E$ )
Alpacas donadoras (OPU)	26	(5.15 ± 0.83) <sup>a</sup>	50 (3.31±2.98) <sup>a</sup>	5(6.15±12.61) <sup>a</sup>	11(17.69±21.27) <sup>a</sup>	21 (36.54±31.71) <sup>b</sup>	13 (31.92±36.14) <sup>b</sup>
Ovarios post mortem	30	(10.33± (0.78) <sup>b</sup>	128(8.53±0.73) <sup>b</sup>	72(56.2±13.98) <sup>b</sup>	19(15.07±5.90) <sup>a</sup>	21(16.47±6.36) <sup>a</sup>	16(12.53±6.70) <sup>a</sup>

a, b. = Letras diferentes indican la existencia de diferencia estadística significativa (P<0.05)

OPU = Recuperación de COCs por el sistema *Ovum pick up*.

Ovarios post mortem=Ovarios de animales sacrificados en el matadero.

N° = Numero de hembras donantes de COCs

Folículos aspirados = Media y error estándar de folículos aspirados/ hembra.

COCs (I) = Número total, media y error estándar de los porcentajes de COCs recuperados por OPU y por aspiración folicular de ovarios post mortem de calidad I

COCs (II) = Número total, media y error estándar de los porcentajes de COCs recuperados por OPU y por aspiración folicular de ovarios post mortem de calidad II

COCs (III) = Número total, media y error estándar de los porcentajes de COCs recuperados por OPU y por aspiración folicular de ovarios post mortem de calidad III

COCs (IV) = Número total, media y error estándar de los porcentajes de COCs recuperados por OPU y por aspiración folicular de ovarios post mortem de calidad IV

En la tabla 3 indica el número de folículos puncionados de ovarios obtenidos post mortem donde fueron superiores ( $10.33 \pm 0.78$ ) al número de folículos aspirados por OPU ( $5.15 \pm 0.83$ ) evidenciando diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) entre ambos métodos de recuperación de gametos. Con respecto al número de COCs colectados, se obtuvo mayores tasas de recuperación de COCs ( $8.53 \pm 0.73$ ) con el método de aspiración folicular de ovarios obtenidos post mortem que con el sistema OPU ( $3.31 \pm 2.98$ ) evidenciando diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) entre ambos métodos.

El método de colección por el sistema OPU influyo negativamente sobre la calidad de los COCs obtenidos, demostrando la obtención de un mayor porcentaje ( $31.92 \pm 36.14$ ) % de COCs de calidad IV recuperados con esta técnica, que con la técnica de aspiración folicular de ovarios obtenidos de matadero donde los COCs de esta calidad fueron solamente del ( $12.53 \pm 6.70$ ) % del total de ovocitos recuperados con esta técnica. Mostrando diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) muy marcadas entre ambos métodos de colección.

Por otro lado, con el método de recuperación de COCs por aspiración folicular de ovarios obtenidos de matadero, obtuvimos mayores porcentajes de COCs ( $56.2 \pm 13.98$ )% de calidad I que con el sistema de colección por OPU, donde solamente el ( $6.15 \pm 12.61$ ) % de los COCs colectados fueron de esta calidad, evidenciando diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ) entre ambos métodos de colección. Sin embargo, el porcentaje de COCs de calidad III obtenidos por esta técnica fueron inferiores ( $16.47 \pm 6.36$ )% al porcentaje de COCs ( $36.54 \pm 31.71$ )% obtenidos por OPU, mostrando así diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) entre ambas técnicas de recuperación de gametos.

El porcentaje de los COCs de calidad II obtenidos tanto con el método de aspiración folicular de ovarios obtenidos de matadero y por OPU fueron similares ( $15.07 \pm 5.90$ )% y ( $17.69 \pm 21.27$ ) % para ovarios obtenidos de matadero y OPU respectivamente sin mostrar diferencias estadísticas significativas entre ambos métodos.

Para evaluar la capacidad de desarrollo embrionario de los COCs provenientes de ovarios de hembras donantes y ovarios obtenidos de matadero, se registraron los datos de desarrollo embrionario de 50 ovocitos provenientes de 26 ovarios de hembras superestimuladas y de 128 ovocitos provenientes de 30 ovarios de animales sacrificados en el Camal Municipal de Huancavelica.

**Tabla 4.** Capacidad meiótica de ovocitos recuperados por *Ovum pick up* (OPU) y ovarios obtenidos post mortem.

Fuente de COCs	N	N° COCs colectados n ( $\bar{X} \pm D.E$ )	COCS División (%) n ( $\bar{X} \pm D.E$ )	Mórula (%) n ( $\bar{X} \pm D.E$ )	Blastocisto temprano (%) n ( $\bar{X} \pm D.E$ )
OPU	26	50 (3.31 $\pm$ 2.98) <sup>a</sup>	35(57.62 $\pm$ 22.08) <sup>a</sup>	33(55.69 $\pm$ 23.82) <sup>a</sup>	33(55.69 $\pm$ 23.82) <sup>b</sup>
Ovario post mortem	30	128(8.53 $\pm$ 2.97) <sup>b</sup>	62(49.00 $\pm$ 11.47) <sup>a</sup>	55 (42 $\pm$ 10.39) <sup>a</sup>	44(34.6 $\pm$ 2.90) <sup>a</sup>

a, b. = letras diferentes indican la existencia de diferencia estadística significativa (P<0.05)

OPU = Recuperación de COCs por el sistema *Ovum Pick-Up*.

Ovario post mortem =Ovarios de animales sacrificados en el matadero

N° = Numero de ovarios utilizados.

COCs = Complejos de Ovocitos Cumulus recuperados por OPU y recuperados por aspiración con jeringa de ovarios obtenidos post mortem

Para evaluar la capacidad meiótica de ovocitos donde se recuperaron 50 y 128 COCs provenientes de ovarios de animales vivos (OPU) y de matadero respectivamente (tabla4). Las tasas de recuperación de COCs fueron mayores 128(8.53 $\pm$ 2.97) utilizando la técnica de aspiración folicular de ovarios de matadero que la tasa de recuperación de COCs utilizando el sistema OPU 50 (3.31  $\pm$ 2.98) evidenciando así diferencias estadísticas significativas (P<0.05) entre el sistema OPU y la aspiración manual de ovarios post mortem.

Con respecto al desarrollo embrionario de COCs obtenidos con el sistema OPU y aspiración folicular de ovarios de camal obtuvimos tasas de división [(57.62 $\pm$ 22.08) y (49.00  $\pm$  11.47)] y mórulas [(55.69 $\pm$ 23.82) y (42 $\pm$ 10.39)] similares de aquellos COCs recuperados por OPU y aspiración folicular de ovarios de camal sin mostrar diferencias estadísticas significativas entre ambos métodos de recuperación de gametas.

Sin embargo, las tasas de blastocistos tempranos provenientes de COCs recuperados por OPU fueron superiores ( $55.69 \pm 23.82$ ) a las tasas de blastocistos tempranos ( $34.6 \pm 2.90$ ) provenientes de COCs recuperados de ovarios de camal evidenciando diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) entre ambos tratamientos.

### **4.3. Discusión de resultados**

#### **Calidad de COCs recuperados por el sistema OPU y de ovarios obtenidos post mortem**

Uno de los objetivos planteados en esta tesis fue evaluar la calidad de COCs recuperados con cada técnica en ese sentido, con la técnica OPU punzamos 26 ovarios superestimulados con 200 UI de eCG y recuperamos 50 COCs con un promedio de 3.31 COCs/donadora, los resultados obtenidos en esta tesis son inferiores a los obtenidos por Gamarra et al., (2007) quienes obtuvieron en promedio 6.0 COCs/donadora después de la recuperación de COCs por OPU de alpacas superestimuladas con 700 UI de ECG. En cuanto a la calidad de COCs obtenidos por esta técnica registramos 6.15; 17.69; 36,54 y 31.92% de COCs de calidad I, II, III y IV respectivamente similares a los obtenidos por Gamarra et al., (2007) quienes obtuvieron 7.4 % de COCs de calidad buena (I y II) después de la aspiración folicular por OPU en el grupo experimental 3 mientras que en el grupo experimental 4 reportó un 64.9% de COCs de calidad buena (I y II). Estos resultados indicarían que si bien la técnica de OPU es una herramienta viable que permite la recuperación de COCs desde animales vivos hace falta la estandarización de un protocolo de aspiración folicular que permita aplicar una determinada presión de vacío durante la recuperación de COCs ya que, en estudios realizados con vacunos, una mayor presión de vacío (80mmHg) aplicado durante la aspiración folicular podría llevar a una menor proporción de COCs de categoría I y II. (Perez et al., 2017), aunque la presión de vacío utilizado en esta tesis fue inferior a la del reporte (50-60 mmHg) es probable que se requiera una presión inferior a la utilizada en esta tesis ya que el volumen folicular de la alpaca es totalmente diferente a la del vacuno.

En cuanto a la recuperación de COCs por aspiración de ovarios de camal punzamos manualmente un total de 30 ovarios utilizando una aguja de 21 G con una jeringa de 5 ml

y obtuvimos 128 COCs con un promedio de 8.53 COCs/ovario, estos resultados son similares a los obtenidos por Gamarra et al., (2007), quienes aspiraron ovarios de alpaca por laparotomía ventral y obtuvieron 7.6 COCs/ovario. Por otro lado, los resultados obtenidos en esta tesis son superiores a los reportados por [Ruiz et al., (2017) y Fernandez et al., (2015)] quienes recuperaron 6.0 y 4.50 COCs/ovario después de la aspiración manual de ovarios de matadero.

En cuando a la calidad de COCs obtuvimos 56.2; 15.0; 16.4 y 12.5% de COCs de calidad I, II, III y IV respectivamente, estos resultados son similares a los obtenidos por [Fernández et al., (2015) y Brogliatti et al., (2000)] quienes obtuvieron [(40.0; 31.1; 8.8 y 20.0%) y (44.4; 20.0; 11.1 y 24.4%)] de COCs de calidad I, II, III y IV respectivamente después de la OPU de alpacas, si bien los porcentajes obtenidos en esta tesis son inferiores a los obtenidos por [Gamarra et al., (2007) y Ruiz et al., (2017)] quienes obtuvieron 81 y 62.3% de ovocitos de buena calidad (I y II) respectivamente, estos resultados indicarían que utilizando agujas de aspiración de mayor diámetro se obtendrían mayores porcentajes de COCs de buena calidad 81% (Gamarra et al., 2007) utilizaron agujas de 18 G (1.20 mm) mientras que utilizando agujas con diámetros inferiores o similares a 20G (0.8mm) se obtienen menores porcentajes (40.0%) de COCs de buena calidad, Fernández et al., (2015)

#### **Capacidad meiótica de ovocitos recuperados por el sistema OPU y de ovarios obtenidos post mortem**

Hasta nuestro conocimiento no existen reportes de evaluación de la capacidad de desarrollo embrionario de COCs recuperados por OPU en alpacas, en ese sentido nosotros obtuvimos 57.6; 55.6 y 55.6% de división, mórula y blastocistos respectivamente, estos resultados son superiores a los reportados por Berland et al., (2002) quienes después de la FIV de COCs de recuperados por OPU obtuvieron 42.5 y 20.5% de mórulas y blastocistos respectivamente, pero las tasas de división (63.0%) obtenidas por este grupo fueron superiores a las tasas de división obtenidas en esta tesis.

Del mismo en esta tesis obtuvimos mayores porcentajes de blastocistos (55.6%) que los reportados por Trasorras et al., (2011) quienes evaluaron la capacidad de desarrollo

embrionario de COCs de llamas sometidas a diferentes medios de cultivo y obtuvieron 20% de blastocistos en el mejor de los casos.

En el grupo de COCs provenientes de ovarios obtenidos de matadero obtuvimos 42.0 y 34.6% de mórulas y blastocistos respectivamente, estos resultados son superiores a los obtenidos por Ruiz et al., (2017) quienes de la FIV de COCs provenientes de camal obtuvieron 41.2 y 17.9% de mórulas y blastocistos respectivamente. Sin embargo, las tasas de división (64.5%) obtenidos por Ruiz et al., (2017) fueron superiores a las tasas de división (49%) en esta tesis. Por otro lado, uno de los reportes pioneros de la FIV en llamas con ovarios obtenidos de matadero son los realizados por Del Campo et al., (1994) quienes obtuvieron blastocistos eclosionados, aunque con tasas inferiores (3.3%) después de los reportes de Ruiz et al., (2017) hasta la fecha son los únicos que han logrado estos estadios de desarrollo embrionario en camélidos. Estos resultados indicarían que si bien la FIV utilizando COCs provenientes de camal son una excelente alternativa para estandarizar protocolos de producción *in vitro* de embriones en camélidos hace falta establecer un protocolo estándar que sea repetible ya que muchos grupos de investigación han mostrado tasas de desarrollo embrionario muy variables y pocos de estos han llegado al estadio transferible de un embrión FIV.

## CONCLUSIONES

- La tasa de recuperación de ovocitos es más eficiente por el método de aspiración folicular de ovarios obtenidos post mortem en comparación al sistema *Ovum pick up* (OPU).
- Los mayores porcentajes de COCs recuperados de calidad I se obtienen con la técnica de aspiración folicular de ovarios obtenidos post mortem 56.2% frente al sistema OPU 6.15%.
- Las mejores tasas de desarrollo embrionario hasta blastocisto temprano se obtienen con la técnica OPU 55.69% en relación con los ovarios obtenidos post mortem 34.6%.
- El sistema OPU es más eficiente para obtener mejores tasas de desarrollo embrionario de ovocitos recuperados de animales vivos.

## RECOMENDACIONES

- Para obtener mayor porcentaje de cantidad y calidad de COCs, se recomienda usar la aspiración folicular de ovarios obtenidos post mortem.
- Para obtener mejores porcentajes de blastocistos tempranos, se recomienda usar el sistema OPU como fuente de información según nuestros resultados.
- Realizar trabajos de investigación acerca de la recuperación de ovocitos por la técnica de OPU, ya que es una técnica repetible de fácil aplicación en un mismo animal de gran valor genético.
- Realizar trabajos de investigación, para estandarizar el protocolo de producción de embriones *in vitro* mediante el sistema OPU.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anel L, Gerra C, Alvarez M, Anel E, Martinez A, Boixo C, Kaabi M, Herraez P, Paz P. (2002). Effect of postmortem interval in quality of epididymal spermatozoa in . *Theriogenology*, 57: 577.
- Apa R, Lanzone A, Miceli F, Mastrandea M, Caruso A, Mancuso A. (1994). Growth hormone induces *in vitro* maturation of follicle- and cumulus- enclosed rat oocyte. *Mol Cell Endocrinol.*, 106:207-12.
- Arainga, W. R. (2011). *Guia de Investigacion Cientifica*. Lima : Fondo Editorial. UCH.
- Brackett B. (1985). In vitro oocytes maturation and fertilization. *J. Anim, Sei* 61:14.
- Brackett B. (1988). Aplicaciones de la fertilización in vitro. En *Avances en Zootécnia* (pág. 159). Zaragoza, España: Acribía.
- Braw-Tal R. (2002). The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? . *Molecular and Cellular Endocrinology*, 22,187,11-18.
- Berland MA, von Baer A, Ruiz J, Parraguez V, Morales P, Adams GP, Ratto MH. (2011). *In vitro* fertilization and development of cumulus oocyte complexes collected by ultrasound-guided follicular aspiration in superstimulated llamas. *Theriogenology*, 75:1482-1488.
- Bearden J. and Fuquay W. (1997). *Applied Animal Reproduction*. 4th Edition A Simon & Schuster Company.
- 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.
- Boni, R. (2012). Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis. *Animal Reproduction*, V.9, 362-369.
- Bowles J, Koopman P. . (2010). Sex determination in mammalian germ cells: extrinsic versus intrinsic factors. *Reproduction* 139, 943-958.

- Brogliatti GM, Palasz AT, Rodriguez-Martinez H, Mapletoft RJ, Adams GP. (2000). Transvaginal collection and ultrastructure of llama (*Lama glama*) oocytes. *Theriogenology*, 54: 1269-1279.
- Buccione R, Schroeder AC and Eppig JJ. (1990). Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod*, 43:543-7.
- Chaubal SA, Molina JA, Ohlrichs CL, Ferre LB, Faber DC, Bols PE, Riesen JW, Tian X, Yang X (2006). Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Science direct; Theriogenology* 65, 1631–1648.
- Condori, R.L.; Huanca, W.; Chileno, M.; Cainzo, J.; Valverde, F.; Becerra, J.J.; Quintela, L.A Herradon, P.G. (2010). Effect of follicle-stimulating hormone addition on *in vitro* maturation and cleavage of alpaca (*vicugna pacos*) embryos. *Reprod. Fertil Dev*, 23, 224.
- Consejo Nacional de Camélidos Sudamericanos (CONACS). (2005). Situación actual de los camelidos sudamericanos.
- Contreras M. (2014). *Evaluación de la calidad de embriones producidos por fertilización in vitro en alpacas (Vicugna pacos)*. Ayacucho -Perú: Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga.
- Corredor E y Páez E. (2012). "Aplicaciones de la ultrasonografía en la reproducción bovina: revisión. *Ciencia y Agricultura Vol. 9 - N° 2*, 29-37.
- Cristofanelli S.; Antonini A.; Torres D.; Polidori P.; Renieri C.. (2004). Meat and carcass quality from Peruvian llama (*Lama glama*)- and alpaca (*Lama pacos*), . *Meat Sci*, 66: 589-593. .
- Cupps P. (1987). *Reproduction in Domestic Animals*. San Diego Calif, 679: 4th. Edition. Academic Press, Inc.
- Dale B. y Elder K. (1997). *In vitro* fertilization. *Cambridge University Press*, 18.
- Del Campo M. Del Campo C, Donoso M, Berland M, R Mapletoft. (1994). *In vitro* fertilization and development of Lama glama oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology* , 41:1219-1229.

- Fernandez Baca, S. (1991). *Avances y perspectivas del conocimiento de los camelidos sudamericanos*. Santiago- Chile: Oficina Regional de la FAO para America Latina y el Caribe.
- Fernandez N., Vasquez T., Manuel G., Perez D., Luis V., Olivera M. y Uri H. (2015). Efecto de dos Métodos de Colección sobre la Cantidad y Calidad Ovocitaria de Alpacas (*Vicugna pacos*) y llamas (*Lama glama*) Post Mortem. *Rev. Investig. Altoandin.*, 3: 331-340.
- Flint A. (1981). An unifying hypothesis for the control of blastocyst growth based on observations on the pig. *J. Reprod. Fertil.*, 29:215-227.
- Galli, C., G. Crotti, C. Notari, P. Turini, R. Duchi, and G. Lazzari. . (2001). EMBRYO PRODUCTION BY OVUM PICK UP FROM LIVE DONORS. *Elsivier; Theriogenology* 55, 1341-1357.
- Gamarra G, Gallegos A, Alvarado E, Asparrin M, Vivanco W. . (2007). Techiques for *Ovum pick up* in gonadotropin- treated alpacas) . *Reprod. Fertil. Dev*, 159-160.
- Gigli I, Russo A, Agüero A. . (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *In Vet.*, 8(1): 183-204.
- Gómez C, Ratto MH, Berland M, Wolter M, Adams GP. (2002). Superstimulatory response and oocyte collection in Alpacas. *Theriogenology*, 57: 584 (Abstract).
- Gonella, Angela, Jorge Atuesta, Sandra Bernal, and Liliana Chacón. (2013). "Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro". *Revista de Investigación Agraria y Ambiental; Volumen 4*, 65-80.
- Gordon I, Lu H. . (1990). Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology*, 33. p77-87. .
- Gordon I. (1994). Laboratory production of cattle embryos. *In CAB International (ed). Biotecnology in Agriculture.*, (11):640p. .
- Gordon, Ian. (2003). Laboratory production of cattle embryos. *Dublin:CABI Publishing*.
- Hafez B. (2000). Foliculogénesis, maduración del óvulo y ovulación. En H. B. En: Hafez ESE, *Reproducción e inseminación artificial en animales* (págs. 70-83). México: Me Graw-Hill Interamericana.

- Handel MA, Schimenti JC. (2010). Genetics of mammalian meiosis: Regulation, dynamics and impact on fertility. *Nature Reviews Genetics* 11, 124-136.
- Hillier S, Smits J, Eichenlaub-Ritter U. (2010). Folliculogenesis and oogenesis: from basic science to the clinic. *Molecular Human Reproduction*, Vol.16, No.9, 617–620, 2010.
- Huanca W, Ratto M, Vásquez M, Cervantes M, Cordero A, Enciso M, Huanca T, Adams G. (2006). Fertilización *In vitro* En Camélidos, I: Recuperación de ovocitos vía transvaginal. *Memorias de la XXIX Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal.* , Huancayo. Perú.
- Huanca, T. (2008). *Efecto de la administración de gonadotropinas Exógenas (FSH Y eCG) en la respuesta ovárica y la producción de embriones en alpacas (Vicugna pacos)*. España: Universidad de Santiago de Compostela
- Huanca, W.; Condori, R.; Cainzos, J.; Chileno, M.; Quintela, L.; Becerra, J.; Herradon, P.G. (2009). *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of alpaca (*Vicugna pacos*) oocytes: effect of time of incubation on nuclear maturation and cleavage. *Reprod. Fertil.Dev*, 22, 327.
- Huanca, W.; Condori, R.L.; Chileno, M.A.; Cainzos, J.; Becerra, J.J.; Quintela, L.A.; Herradon, P.G.,. (2010). *In vivo* maturation and *in vitro* fertilization of alpaca oocytes. . *Reprod. Fertil. Dev*, 23: 204.
- Huanca, W. (2012). Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos como alternativas para la mejora genética. *VI Congreso Internacional de Ganadería de Doble Propósito – XVI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal*.
- Hunt PA, Hassold TJ. (2008) Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends Genet* 24:86–93
- Hunter R. (1990). Fertilization of pig eggs *in vivo* and *in vitro*. *Journal of reproduction and fertility*., Supplement 40: 211-226.
- Hunter M. (2000). Oocyte maturation and ovum quality in pigs. . *Rev Reprod*, 5:122-30
- Hunter R. (2004). Capacitation of mammalian spermatozoa *in vivo*, with a specific focus on events in the fallopian tubes. *Mol Reprod Dev*, 67(2): 243-50.

- INEI. (2012). *Instituto Nacional de Estadística e Informática*. Obtenido de IV Censo Nacional Agropecuario:  
<http://censos.inei.gob.pe/cenagro/tabulados/?id=CensosNacionales>
- Karadjole, Martina, et al. (2010). The developmental competence of bovine immature. *oocytes and quality of embryos derived from slaughterhouse ovaries or live donors by Ovum pick up*, 445-454.
- Lambert R., Sirard M., Bernard C., Bely R., Rioux J., Leclerc P., Menard D. (1986). *n vitro Fertilization of bovine oocytes matured in vivo*. *Theriogenology*, 25:117.
- Landeo L. (2018). Producción de embriones de alpacas por fecundación *in vitro* a partir de ovocitos vitrificados. Tesis para optar el título de Magister en Reproducción Animal. *Tesis para optar el título de Magister en Reproducción Animal*.
- Landeo L., Ramos Y., Artica M., Ruiz J. (2017). Efecto del medio de cultivo sobre el desarrollo de embriones *in vitro* de alpacas. *XL Reunion Científica de la Asociación Peruana de Producción animal. Chachapoyas. Peru*.
- Liebfried R. (1996). Factors determining competence of *in vitro* produced cattle embryos. *Theriogenology*, 51: 473-485.
- Lliteras, Emilia, and M. Chong. (2009). "Avances en la criopreservación de ovocitos." *Ciencia y tecnología ganadera; Vol. 3 No. 1*, 1-13.
- Lonergan P, D Rizos, J Kanka, L Nemcova, AM Mbaye, M Kingston, M Wade, P Duffy, MP Boland. (2003). Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction*, 126: 337-346.
- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 37: 48-53.
- Martinez, M.F.; G.O. Adams; J.P. Kastelic; D.R. Bergfel; R.J. Mapletoft. (2000). Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial. *Theriogenology* 54, (5): 757-69.
- Mehlmann L, Jones T and Jaffe L. (2002). Meiotic arrest in the mouse follicle. *Science*, 297:143-1345.

- Mellisho, E.; Rivas, V.; Ruiz, J.; Mamani, G. . (2014). Effect of sperm selection on the rate of *in vitro* fertilization in alpaca (*Vicugna pacos*). *Reproduction, Fertility and Development*, 27: 217-218.
- 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 partenogenético *in vitro* de ovocitos de alpaca. *XXXI Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal*.
- 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*, 54, 449-460.
- Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL, Dieleman SJ. (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59: 651-674.
- Oikawa, Toshinori, Tomoko Itahashi, and Takashi Numabe. (2016). Improved embryo development in Japanese black cattle by *in vitro* fertilization using *Ovum pick up* plus intracytoplasmic sperm injection with dithiothreitol . *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 62, 11-16.
- Palma GA. (2001). *Producción in vitro de embriones*. INTA Balcarce: En Palma GA. Primera edición.
- Parrish, J.J., J.L. Susko - Parrish, M-L. Leibfried-Rutledge, E.S. Critser, Eyestone y N.L. First W.H. (1986). Bovine *in vitro* fertilization with frozen - thawed semen. *Theriogenology* , 25:591 -600.
- Pepling ME. (2006). From primordial germ cell to primordial follicle. *mammalian female germ cell development* *Genesis* 44 , 622-632.
- Perez M.; Zeballos J; Perez U. (2017). Comparación de sistemas de cultivo de embriones de alpacas. *Rev. Investig. Altoandín.*, 19, 157-164.
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruip M, Taverne M. (1998). Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of ovaries. *Theriogenology*, 30: 751-762.
- Ratto M, Wolter M, Gomez C, Berland M, Adams GP. (1999). *In vitro* maturation of llama oocytes. In: *Proceedings of the II Congreso Mundial sobre Camélidos*.

- Ratto M, Berland M, Adams GP. (2002). Ovarian superstimulation and ultrasound-guided oocyte collection in llamas. *Theriogenology*, 57:590.
- Ratto M, Berland M, Huanca W, Singh J, Adams GP. (2005). *In vitro* and in vivo maturation of llama oocytes. *Theriogenology*, 63: 2445-2457.
- Ratto M, Gomez C, Berland M, Adams GP. (2007). Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Anim. Reprod. Sci.*, 97: 246-256.
- Ruiz J.A., y J.E. Correa. (2007). Maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca y llama aspirados vía laparoscópica. *1 Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica, Peru.*
- Ruiz J., (2011). *Producción y Tecnología en Camelidos Sudamericanos*. Perú: Universidad Nacional de Huancavelica.
- Ruiz J, Ratto M. (2011). Capacidad de desarrollo de ovocitos recuperados via aspiracion transvaginal en llamas y alpacas. *Spermova*, 77-79.
- Ruiz, J.; Landeo, L.; Mendoza, J.; Artica, M.; Correa, J.; Silva, E.; Miragaya, M.; Ratto, M.H., (2013). Effect of ethylene glycol concentration and time of exposure in the equilibration and vitrification solutions. *Animal Reproduction Science*, 72-78.
- Ruiz J., Landeo L., Mendoza J., Artica M., Correa J.E., Silva M., Miragaya M., Ratto M.H., (2013). Vitrification of *in vitro* mature alpaca oocyte: effect of ethylene glycol concentration and time of exposure in the equilibration and vitrification solutions. *Anim Reprod Sci*, 143: 72-8.
- Ruiz J. (2015). Estado de la producción de embriones *in vitro* en camelidos sudamericanos. *ASPRA*, 264-269.
- Ruiz J., Santayana P., Mendoza J., Landeo L., Huaman E., Ticllacuri F., Mujica F., Silva M., Ratto M. (2017). Effect of oocyte maturation time, sperm selection method and oxygen tension on *in vitro* embryo development in alpacas. *Theriogenology* 95, 127-132.
- Ruiz J. (2018). Producción y transferencia de embriones *in vitro* en camelidos sudamericanos: Nuevas oportunidades y desafíos. *Spermova*, 54-60.

- Ruiz J. (2019). Avances de investigación en camelidos sudamericanos. En j. R. Bejar, *Avances de investigación en camelidos sudamericanos* (págs. 75-80). Huancavelica: Universidad Nacional de Huancavelica.
- Salvá, BK.; Zumalacárregui JM.; Figueira, AC.; Osorio, MT.; Mateo, J., . (2009). Nutrient composition and technological quality of meat from alpacas reared in Peru. *Meat Sci*, 82: 450-455.
- Sampieri, R. (2014). *Metodología de la Investigación* (6ta edición ed.). Mexico: Mc Graw Hill Education.
- Sánchez F, Smitz J. (2012). Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1822, 1896-1912.
- Sansinena M, Taylor SA, Taylor PJ, Schmidt EE, Denniston R y Godke R. (2007). *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Anim Reprod Sci*, 99:342-53.
- Santayana P. (2011). *Tiempo de maduración de ovocitos Vicugna pacos «alpaca» en el desarrollo embrionario por fecundación in vitro, Huancavelica*. Ayacucho -Perú: Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga.
- Santayana P, Mendoza J, Landeo L, Mujica F, Ruiz J. (2012). Tiempo de maduración de ovocitos de alpaca en el desarrollo embrionario por fecundación in vitro. *VI Congreso Mundial de Camélidos*.
- Santiani A. (2012). Uso de dos Análogos de Su peróxido Dismutasa para prevenir la Desestabilización Espermiática Prematura durante la Criopreservación y Vitricación en espermatozoides de Alpaca. *Tesis de Post grado Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos*.
- Sato E., Iritani A. Nishikawa Y. (1982). Analysis of the hours required for germinal vesicle breakdown in pig y cattle oocytes. . *J. Fert. Steril*, 27:112.
- Sawyer HT, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield SJ, McNatty KP. (2002). Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol Reprod* , 66:1134-50.
- Shamsuddin M., Larsson B. Rodríguez H. (1993). Maturation related changes in bovine oocytes under different culture conditions. . *Anim. Reprod.* , ScI. 31:49.

- Thibault C. (1977). Are follicular maturation and oocyte maturation independent. *J. Reprod. and Fert*, 51.1.
- Trasorras, V.L.; S. Giuliano; M.G. Chaves; D. Neild; A. Agüero; M. Carretero; M. Pinto; C. Baca Castex; A. Alonso, D. Rodriguez, D., Morrell; M. Miragaya. (2011). *In vitro* embryo production in llamas (*Lama glama*) from in vivo matured oocytes with raw semen processed with AndrocolLE using defined embryo culture media. *Reproduction in Domestic Animals*, DOI: 10.1111.
- Trasorras, V.; Giuliano, S.; Chaves, M.; Baca Castex, C.; Carretero, V.; Negro, A.; Rodriguez, D.; Miragaya, M. (2012). *In vitro* embryo production in llamas (*Lama glama*) from in vivo matured oocytes with raw semen processed with AndrocolLE using defined embryo culture media. *Reprod Domest Anim*, 47(4): 562-7.
- Trasorras V, Giuliano S, Miragaya M. . (2013). *In vitro* production of embryos in South American camelids. *Animal Reproduction Science* 136 , 187– 193.
- Trasorras V, Castex CB, Alonso A, Giuliano S, Cruz RS, Arraztoa C, Chaves G, Rodríguez D, Neild D, Miragaya M. . (2014). First llama (*Lama glama*) pregnancy obtained after *in vitro* fertilization and *in vitro* culture of gametes from live animals. . *Animal Reproduction Science*, 148(1-2): 83–89.
- Trasorras VL, Carretero MI, Neild DM, Chaves MG, Giuliano SM and Miragaya MH. (2017). Production, Preservation, and Transfer of South American Camelid Embryos. *Front. Vet. Sci.*, 4:190.
- Xia P, Tekpetey FR and Armstrong DT. (1994). Effect of IGF-I on pig oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development in vitro, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity. *Mol Reprod Dev*, 38(4):373-9.

## Apéndice

**Tabla 5.** Datos registrados de la superestimulación ovárica con 200 UI de ECG de alpacas donantes para la recuperación de Complejo ovocitos cúmulus (COCs) por *Ovum pick up*.

Tratamiento	Hembra	N° Folículos detectados	N° Folículos Aspirados	N° COCs Colectados	Tasa de COCs recuperados (%)
eCG	1	2	0	0	0
eCG	2	2	2	1	50
eCG	3	7	7	5	71
eCG	4	12	12	10	83
eCG	5	8	8	5	62
eCG	6	7	7	2	28
eCG	7	0	0	0	0
eCG	8	8	8	6	75
eCG	9	6	5	4	80
eCG	10	4	4	4	100
eCG	11	2	0	0	0
eCG	12	2	2	1	50
eCG	13	7	7	5	71

Para el ensayo de superestimulación ovárica se utilizaron 15 alpacas hembras donantes de COCs, de los cuales solo 13 respondieron al protocolo de ovulación inducida con GnRH y fueron sometidas a un protocolo de superestimulación ovárica con la aplicación de 200 UI de eCG.

**Tabla 6.** Respuesta ovárica a la superestimulación ovárica con eCG de alpacas donantes para la recuperación de complejo ovocito-cumulus (COCs) por *Ovum pick up*.

Tratamiento	Variable	N	Media	D.E.	Mín	Máx
eCG	N° Folículos detectados	67	5.15	3.44	0	12
eCG	N° Folículos Aspirados	62	4.77	3.79	0	12
eCG	N° COCs Colectados	50	3.31	2.98	0	10
eCG	Tasa de ovocitos recuperados (%)	13	51.54	34.27	0	100

**Tabla 7.** Desarrollo embrionario de ovocitos recuperados por OPU y ovarios de matadero

<b>Tratamiento</b>	<b>Hembra</b>	<b>N° COCs colectados</b>	<b>División (%)</b>	<b>Mórula (%)</b>	<b>Blastocisto Temprano (%)</b>
OPU	1	0	0.00	0.00	0.00
OPU	2	1	100.00	100.00	100.00
OPU	3	5	60.00	60.00	60.00
OPU	4	10	60.00	60.00	60.00
OPU	5	5	60.00	60.00	60.00
OPU	6	2	50.00	50.00	50.00
OPU	7	0	67.00	67.00	67.00
OPU	8	6	50.00	50.00	50.00
OPU	9	4	75.00	75.00	75.00
OPU	10	4	60.00	60.00	60.00
OPU	11	0	50.00	50.00	50.00
OPU	12	1	67.00	67.00	67.00
OPU	13	5	50.00	25.00	25.00
Ovarios post mortem	1	15	42.00	38.00	38.00
Ovarios post mortem	2	7	42.00	38.00	38.00
Ovarios post mortem	3	12	42.00	38.00	38.00
Ovarios post mortem	4	6	45.00	36.00	32.00
Ovarios post mortem	5	8	71.00	62.00	33.00
Ovarios post mortem	6	13	42.00	38.00	38.00
Ovarios post mortem	7	6	45.00	36.00	32.00
Ovarios post mortem	8	5	42.00	38.00	38.00
Ovarios post mortem	9	7	45.00	36.00	32.00
Ovarios post mortem	10	7	42.00	38.00	38.00
Ovarios post mortem	11	10	45.00	36.00	32.00
Ovarios post mortem	12	7	45.00	36.00	32.00
Ovarios post mortem	13	11	71.00	62.00	33.00
Ovarios post mortem	14	6	45.00	36.00	32.00
Ovarios post mortem	15	8	71.00	62.00	33.00

**Tabla 8.** Datos tabulados de la calidad de COCs recuperados por *Ovum pick up* (OPU) y ovarios de camal.

Origen de COCs	Hembra	N° Folículos puncionados	N° COCs colectados	Calidad de COCS (%)			
				I	II	III	IV
OPU	1	2	0	0	0	0	0
OPU	2	2	1	0	0	0	100
OPU	3	7	5	20	40	40	0
OPU	4	12	10	20	30	40	10
OPU	5	8	5	0	0	60	40
OPU	6	7	2	0	0	100	0
OPU	7	0	6	0	0	50	50
OPU	8	8	4	0	50	0	50
OPU	9	6	4	0	0	75	25
OPU	10	4	1	0	0	0	100
OPU	11	2	5	0	40	20	40
OPU	12	2	5	40	20	40	0
OPU	13	7	2	0	50	50	0
Ovarios post morterm	1	15	15	53	13	27	7
Ovarios post morterm	2	7	7	57	14	29	0
Ovarios post morterm	3	13	12	17	33	25	25
Ovarios post morterm	4	9	6	67	17	17	0
Ovarios post morterm	5	14	8	63	13	13	13
Ovarios post morterm	6	8	13	69	8	8	15
Ovarios post morterm	7	9	6	50	17	17	17
Ovarios post morterm	8	8	5	40	20	20	20
Ovarios post morterm	9	10	7	57	14	14	14
Ovarios post morterm	10	10	7	57	14	14	14
Ovarios post morterm	11	12	10	70	10	10	10
Ovarios post morterm	12	9	7	57	14	14	14
Ovarios post morterm	13	14	11	73	9	9	9
Ovarios post morterm	14	8	6	50	17	17	17
Ovarios post morterm	15	9	8	63	13	13	13

### Estadística no Paramétrica

Para las variables calidad I, II, III y IV se realizó la Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Origen de COCs	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
I	CAMAL	15	56.20	13.98	57.00	18.75	<0.0001
I	OPU	13	6.15	12.61	0.00		

#### Trat. Medias Ranks

OPU 6.15 7.27 A

CAMAL 56.20 20.77 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Variable	Origen de COCs	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
II	CAMAL	15	15.07	5.90	14.00	0.21	0.6415
II	OPU	13	17.69	21.27	0.00		

Variable	Origen de COCs	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
III	CAMAL	15	16.47	6.36	14.00	2.45	0.1160
III	OPU	13	36.54	31.71	40.00		

Variable	Origen de COCs	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
IV	CAMAL	15	12.53	6.70	14.00	0.58	0.4430
IV	OPU	13	31.92	36.14	25.00		

Para las variables división, mórula y blastocisto temprano se realizó la Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
N° COCs colectados	OPU	13	3.31	2.98	4.00	14.62	0.0001
N° COCs colectados	ovarios de camal	15	8.53	2.97	7.00		

Trat.	Medias	Ranks	
OPU	3.31	8.12	A
Ovarios de camal	8.53	20.03	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Division (%)	OPU	13	57.62	22.08	60.00	5.85	0.0143
Division (%)	ovarios de camal	15	49.00	11.47	45.00		

Trat.	Medias	Ranks	
ovarios de camal	49.00	11.00	A
OPU	57.62	18.54	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Morula (%)	OPU	13	55.69	23.82	60.00	4.59	0.0301
Morula (%)	ovarios de camal	15	42.00	10.39	38.00		

Trat.	Medias	Ranks	
ovarios de camal	42.00	11.40	A
OPU	55.69	18.08	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Blas. Temprano (%)	OPU	13	55.69	23.82	60.00	9.67	0.0016
Blas. Temprano (%)	ovarios de camal	15	34.60	2.90	33.00		

Trat.	Medias	Ranks	
ovarios de camal	34.60	10.00	A
OPU	55.69	19.69	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

**Foto N° 01.** Selección de alpacas del CIDCS de la UNH para OPU.



**Foto N° 02.** Tratamiento de superovulación ovárica con la hormona.



**Foto N° 03.** Evaluación ecográfica de la respuesta ovárica de la alpaca.



**Foto N° 04.** Evaluación ecográfica de la respuesta ovárica de la alpaca.

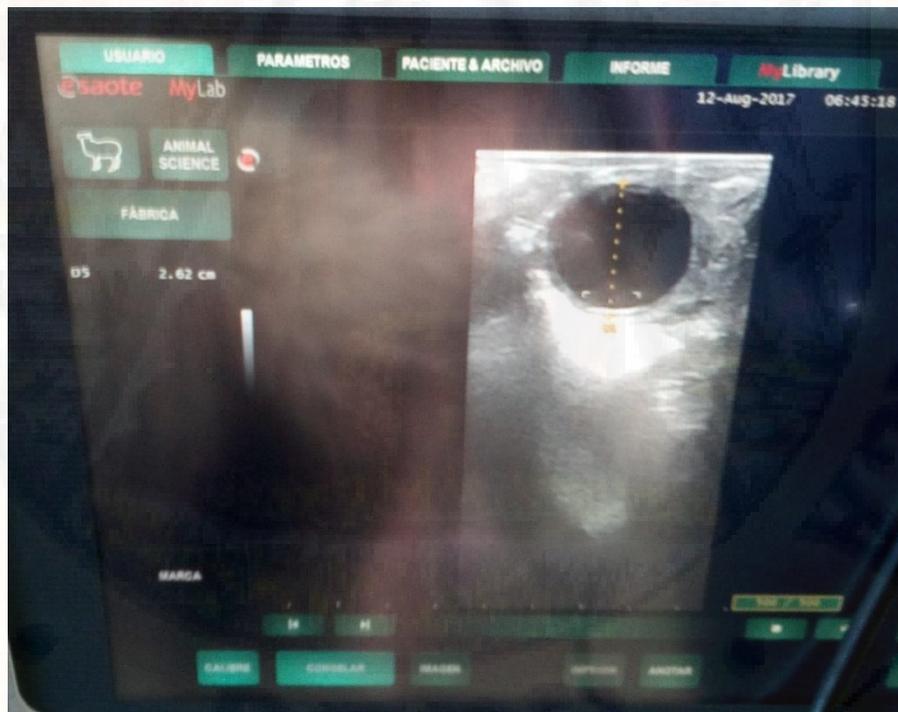


Foto N°05. Sistema OPU.



N° 06. Bomba de aspiración conectada con la aguja de aspiración folicular.



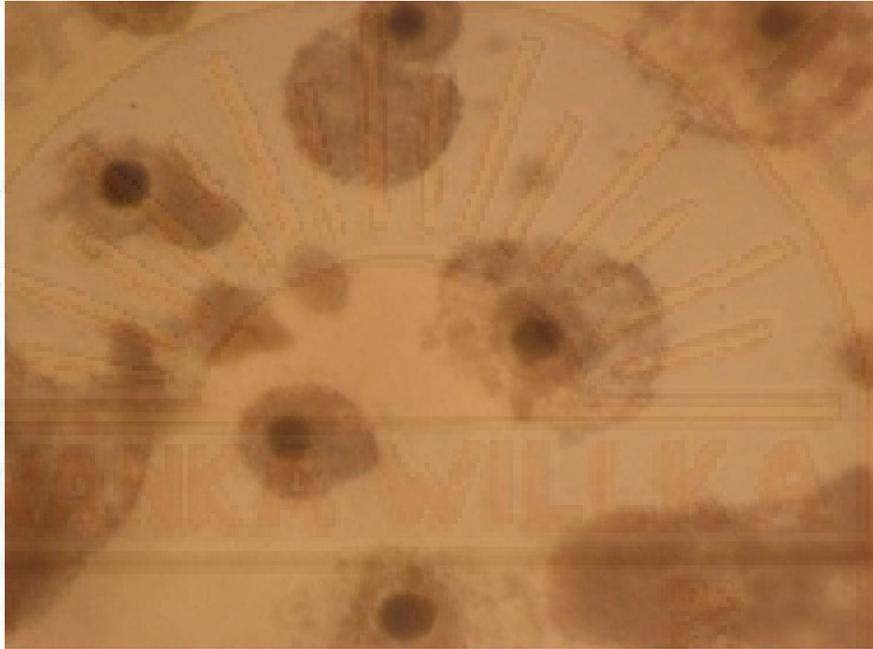
**Foto N° 07.** Recuperación de COCs por el sistemaOPU.



**Foto N° 08.** COCs recuperados por OPU



**Foto N° 09.** Evaluación de COCs recuperados por el sistema OPU.



**Foto N° 10.** Recuperación de COCs obtenidos de ovarios de camal.



**Foto N° 11. Ovarios de camal**



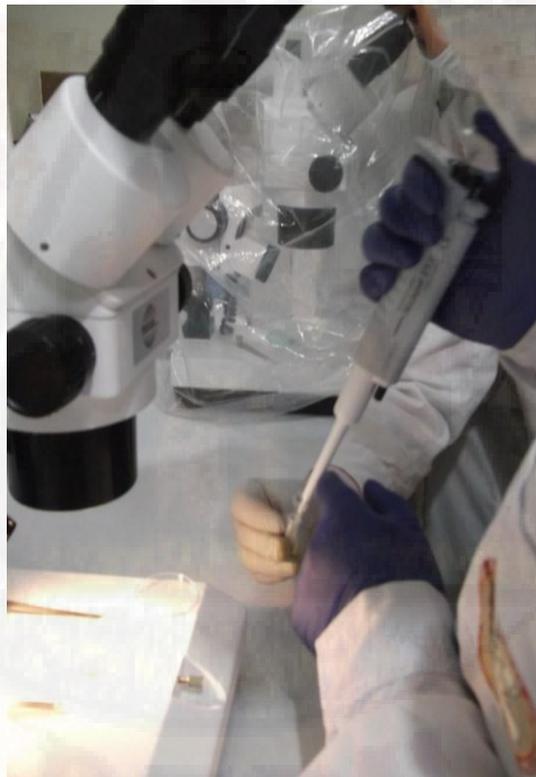
**Foto N° 12. Aspiración folicular de COCs de ovarios obtenidos del camal.**



**Foto N° 13.** Testículos obtenidos del camal.



**Foto N° 14.** FIV de ovocitos de alpaca.



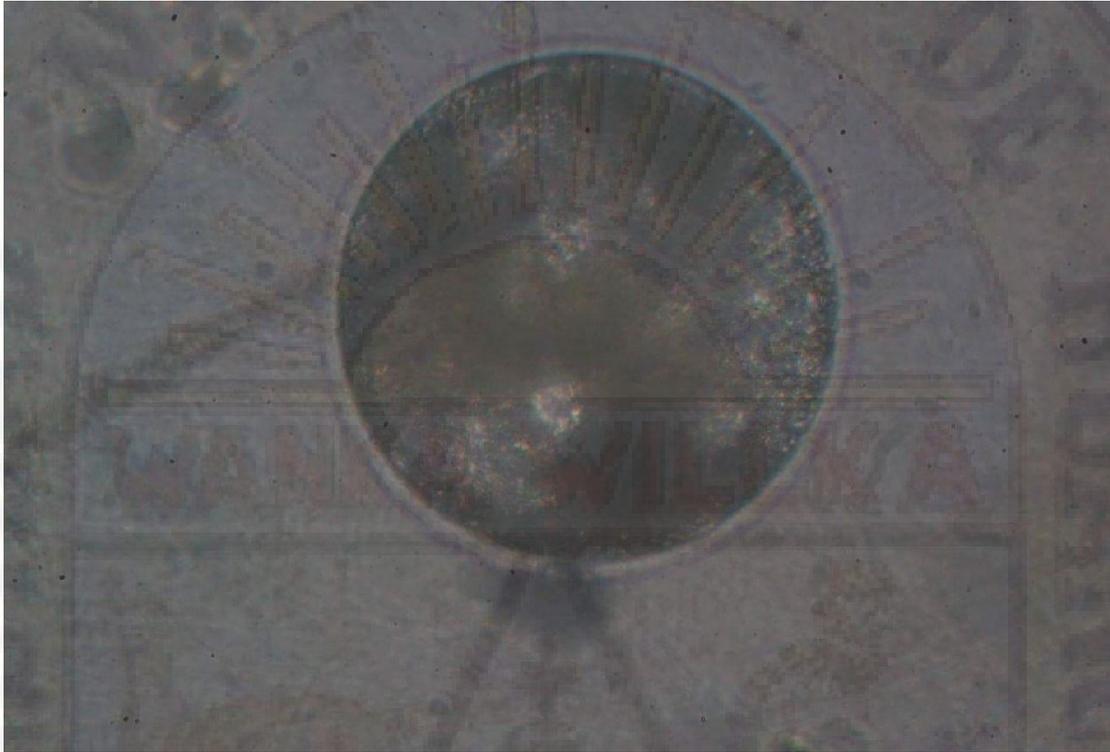
**Foto N° 15.** Desarrollo Embrionario.



**Foto N° 16.** Evaluación de desarrollo embrionario de la alpaca.



**Foto N° 17.** Evaluación de desarrollo embrionario de la alpaca.



### Matriz de consistencia

Título	Problema	Objetivos	Variables	Método
<p>Evaluación de la capacidad meiótica de ovocitos de alpacas (<i>Vicugna pacos</i>) recuperados por sistema <i>Ovum pick up</i> (OPU) y de ovarios obtenidos post mortem.</p>	<p>¿Cuál es la capacidad meiótica de complejo ovocitos cúmulus (COCs) recuperados mediante la técnica de <i>Ovum pick up</i> en alpacas (<i>Vicugna pacos</i>) y los complejo ovocitos cúmulus (COCs) provenientes de ovarios obtenidos post mortem?</p>	<p><b>Objetivo general</b>                      Evaluar la capacidad meiótica de complejo ovocitos cúmulus (COCs) recuperados mediante la técnica de <i>Ovum pick up</i> en alpacas (<i>Vicugna pacos</i>) y los complejo ovocitos cúmulus (COCs) provenientes de ovarios obtenidos post mortem.</p> <p><b>Objetivos Específicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluar la calidad de complejo ovocitos cúmulus (COCs) recuperados por <i>Ovum pick up</i> (OPU), en alpacas (<i>Vicugna pacos</i>).</li> <li>• Evaluar la calidad de complejo ovocitos cúmulus (COCs) recuperados de ovarios obtenidos post mortem, en alpacas (<i>Vicugna pacos</i>).</li> <li>• Evaluar la capacidad de desarrollo embrionario de complejo ovocitos cúmulus (COCs) recuperados por <i>Ovum pick up</i> (OPU), en alpacas (<i>Vicugna pacos</i>).</li> <li>• Evaluar la capacidad de desarrollo embrionario de complejo ovocitos cúmulus (COCs) recuperados de ovarios obtenidos post mortem, en alpacas (<i>Vicugna pacos</i>).</li> </ul>	<p><b>Variable independiente</b>                      Calidad de COCs</p> <p><b>Variable dependiente</b>                      Capacidad meiótica de ovocitos de alpacas</p>	<p><b>Tipo de investigación</b>                      Básica</p> <p><b>Nivel de investigación</b>                      Explicativa</p> <p><b>Población</b>                      30 alpacas hembras</p> <p><b>Muestra</b>                      56 ovarios de alpacas hembras                      20 testículos de alpacas machos</p> <p><b>Muestreo</b>                      No probabilística por conveniencia</p> <p><b>Técnica</b>                      Aspiración folicular por OPU                      Aspiración folicular manual</p> <p><b>Instrumentos de recolección de datos</b>                      Registros para obtención de muestra                      Registros de recuperación, maduración de ovocitos                      Ficha de evaluación seminal                      Ficha de producción de embriones</p>