

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Tesis

Temperatura y medio de transporte de ovarios de alpaca (*Vicugna pacos*) sobre el porcentaje de maduración y fecundación *in vitro*

Presentado por:

Rossy Bocangel Arroyo

Para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista

Abancay, Perú

2025



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

Temperatura y medio de transporte de ovarios de alpaca (*Vicugna pacos*) sobre el porcentaje de maduración y fecundación *in vitro*

Presentado por **Rossy Bocangel Arroyo**, para optar el título de:
Médico Veterinario y Zootecnista

Sustentado y aprobado el 06 de febrero de 2025 ante el jurado evaluador:

Presidente:



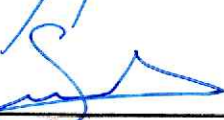
Dra. Sebastiana Virginia Bernilla De La Cruz

Primer miembro:



M.Sc. Julio Iván Cruz Colque

Segundo miembro:



Ing. Mg. Sc. Jhonatan Steve Inca Moreano

Asesores:



PhD. Oscar Elisban Gómez Quispe



Mg. Shirley Sujey Evangelista Vargas



Constancia de similitud

Informe de Tesis Constancia 11-2025-UDI-FMVZ-UNAMBA

El director de la Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

Hace constar:

Que, **Rossy Bocangel Arroyo**, con código de estudiante **121198** de la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, presentó el informe de tesis:

Temperatura y medio de transporte de ovarios de alpaca (*Vicugna pacos*) sobre el porcentaje de maduración y fecundación *in vitro*

Para ser evaluada su similitud.

Se utilizó el software Turnitin con filtros: excluir citas, excluir bibliografía, excluir fuentes que tengan menos de 18 palabras. Siendo el resultado:

Porcentaje de similitud: 11%

Parte de esta constancia son los anexos donde figuran los resultados del Turnitin.

Se expide la presente, a solicitud del interesado para fines de trámites en la UNAMBA.

Abancay, 13 de febrero de 2025

Atentamente,



Dr. Ulises S. Quispe Gutiérrez
Director

investigacion.fmvz@unamba.edu.pe
cc/.
Arch.

Agradecimiento

A mi madre, quien incondicionalmente me ha apoyado para lograr mis objetivos.

A mi padre, quien me ha enseñado a ser perseverante y resiliente.

A mi hermana Liset, quien ha confiado siempre en mí y muchas veces ha sido mi fortaleza para continuar pese a las dificultades.

A mi esposo por motivarme a salir de mi zona de confort y atreverme a tener nuevas experiencias que resultaron en este trabajo de tesis.

A mis asesores quienes me dieron la oportunidad de ser parte de esta investigación.

Al proyecto 118-2020-FONDECYT



Dedicatoria

Dedico el esfuerzo que conlleva este trabajo, a mi hijo Gareth Angel, que sin saberlo ha motivado en mi vida muchos cambios positivos.



Temperatura y medio de transporte de ovarios de alpaca (*Vicugna pacos*) sobre el porcentaje de maduración y fecundación *in vitro*
Línea de investigación: Ciencias veterinarias

Esta publicación está bajo una Licencia Creative Commons



ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.1 Descripción del problema	4
1.2 Enunciado del Problema	5
1.2.1 Problema general	5
1.2.2 Problemas específicos	5
1.2.3 Justificación de la investigación	5
CAPÍTULO II	7
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	7
2.1 Objetivos de la investigación	7
2.2.1 Objetivo general	7
2.2.2 Objetivos específicos	7
2.2 Hipótesis de la investigación	7
2.2.3 Hipótesis general	7
2.2.4 Hipótesis específicas	7
2.3 Operacionalización de variables	8
CAPÍTULO III	9
MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	9
3.1 Antecedentes	9
3.1.1 Antecedentes Nacionales	9
3.1.2 Antecedentes Internacionales	15
3.2 Marco teórico	19
3.2.1 Biotecnología reproductiva	19
3.2.2 Fisiología reproductiva de la alpaca	20
3.2.3 Anatomía del ovario de alpaca	20
3.2.4 Tamaño del folículo	21
3.2.5 Factores que influyen en la maduración y fecundación <i>in vitro</i>	21
3.2.6 Complejo cúmulo-ovocitos (COC)	22
3.2.7 Categoría del ovocito	23
3.2.8 Técnicas de recuperación de los COC.	23
3.2.9 Obtención de ovocitos	24
3.2.10 Tiempo y temperatura de transporte de ovarios	24



3.2.11	Maduración <i>in vitro</i>	25
3.2.12	Maduración del núcleo del ovocito	25
3.2.13	Fecundación <i>in vitro</i>	26
3.2.14	Medio de maduración <i>in vitro</i> IVM	26
3.2.15	Medio de fecundación <i>in vitro</i> FIV	27
3.2.16	Transferencia de embriones	27
3.3	Marco conceptual	27
CAPÍTULO IV		29
METODOLOGÍA		29
4.1	Tipo y nivel de investigación	29
4.2	Diseño de la investigación	29
4.3	Población y muestra	29
4.4	Procedimiento	30
4.5	Técnica e instrumentos	31
4.6	Análisis estadístico	32
CAPÍTULO V		33
RESULTADOS Y DISCUSIONES		33
5.1	Análisis de resultados	33
5.1.1	Temperatura y medio de transporte sobre la maduración de ovocitos de alpacas (<i>Vicugna pacos</i>)	33
5.1.2	Temperatura y medio de transporte sobre el porcentaje de fecundación de ovocitos de alpacas (<i>Vicugna pacos</i>).	33
5.2	Discusión	34
CAPÍTULO VI		37
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		37
6.1	Conclusiones	37
6.2	Recomendaciones	37
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS		38
ANEXOS		43

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Operacionalización de temperatura, medio de transporte de ovarios, maduración y fecundación in vitro de alpacas (<i>Vicugna pacos</i>)	8
Tabla 2. Efecto de la temperatura y el medio de transporte sobre el porcentaje de la aduración de ovocitos.	33
Tabla 3. Efecto de la temperatura y el medio de transporte sobre el porcentaje de fecundación de ovocitos	34
Tabla 4. Análisis de varianza	44
Tabla 5. Comparación de medianas	44
Tabla 6. Evaluación de normalidad: Anderson-Darling	45
Tabla 7. Análisis de varianza y comparación de medias para porcentaje de fecundación	45
Tabla 8. Comparación de medias	45
Tabla 9. Test de normalidad: Anderson-Darling	46
Tabla 10. Datos de ovocitos transportados a 5 °C	47
Tabla 11. Datos de ovocitos transportados a 15 °C	48

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Microscopio invertido evos, clasificación de categoría de ovocitos.	49
Figura 2. Ovocitos de alpaca de diferentes categorías	49
Figura 3. Cabina de flujo laminar para trabajar la maduración y fecundación de ovocitos	50
Figura 4. Equipos de laboratorio utilizados para la investigación	50
Figura 5. Ovocitos clasificados según categoría I y II.	51
Figura 6. Pocillos pre calentados con medio para maduración de ovocitos.	51
Figura 7. Ovulo fecundado, se observa la extrucción del primer y segundo cuerpo polar.	52
Figura 8. Embrión de alpaca de 4 células.	52
Figura 9. Ovocito maduro, se observa la extrucción del primer cuerpo polar.	53
Figura 10. Ovocito de categoría 1 con 5 o más filas de células del cumulus y citoplasma homogéneo.	53
Figura 11. Ovocito categoría 1. De 5 a más filas de células del cumulus y citoplasma homogéneo.	54
Figura 12. Ovocito categoría 2: con citoplasma homogéneo y 3 filas de células del cumulus	54
Figura 13. Ovocito categoría 3: con citoplasma homogéneo y menos de 3 filas de células del cumulus incompletas	55
Figura 14. Ovocito categoría 4. Citoplasma homogéneo y desnudo	55

ABREVIATURAS

ART: tecnología de reproducción asistida
BSA: suero albúmina bovina
CO₂: dióxido de carbono
COC: complejo cúmulo ovocito
CSA: camélidos sudamericanos
DK: diacinesis
eCG: gonadotropina coriónica equina
FBS: suero fetal bovino
FIV: fecundación *in vitro*
FSH: hormona foliculoestimulante
GV: vesícula germinal
ICSI: inyección intracitoplasmática
IVM: maduración *in vitro*
MEM: medio mínimo esencial
M-I: metafase 1
M-II: metafase 2
PBS: solución salina tamponada con fosfato
SOFm: medio fluido de oviducto sintético
TALP: medio de tyrode base, albúmina, lactato y piruvato
TCM: medio de cultivo de tejidos
TCM: medio de cultivo de tejidos
YHF: yema de huevo fresca

INTRODUCCIÓN

La biotecnología reproductiva comprende el uso de técnicas que permiten incrementar la eficiencia reproductiva, mejorar la calidad genética, ayudar en la conservación de especies en peligro de extinción, conservar y transportar el material genético para su posible utilización futura¹. El conocimiento de la fisiología reproductiva de los camélidos sudamericanos (CSA) todavía es incompleto debido a las particularidades en su fisiología reproductiva como el ciclo estral estacional y la gestación prolongada. Las diferentes técnicas de reproducción asistida como la inseminación artificial y la transferencia de embriones, en algunos estudios no han sido exitosos, ya que no se cuenta con información consistente para mantener viable el material genético de las alpacas en condiciones *in vitro*². La inseminación artificial (IA) es la biotecnología más antigua que se ha utilizado en la reproducción asistida de animales, siendo en la práctica la introducción del semen en el tracto genital de la hembra³. La maduración *in vitro* (IVM) es el primer paso para iniciar con la creación de un nuevo organismo ya que permite que óvulos inmaduros maduren en un entorno controlado de laboratorio. La fecundación *in vitro* (FIV) es la unión del ovulo y el espermatozoide fuera del cuerpo, la fecundación es indicador de que el espermatozoide se ha fijado y a ingresado al óvulo⁴. Se investigan diversos protocolos para que llegue a ser factible la fecundación *in vitro* en alpacas ya que tiene bajo potencial de ovocitos para lograr la IVM y a esto se suma la dificultad para conseguir muestras de ovarios de alpacas en mataderos⁵; es por ello, la necesidad del conocimiento de protocolos adecuados para el almacenamiento y transporte de ovarios, así obtener mejores resultados de fecundación *in vitro*. Desde el momento de la toma de muestra existen factores externos como la temperatura y el medio de transporte que pueden influir en la maduración y fecundación de ovocitos en laboratorio, más aún cuando se trata de técnicas de obtención *post mortem* del animal⁶. Para la utilización de esta biotecnología es necesario mantener la calidad de los ovarios durante el transporte y la buena condición de los ovocitos después de la extracción folicular, así como también el protocolo de maduración *in vitro* que es básico para los resultados de la FIV⁷. El propósito de este estudio es evaluar el efecto de la temperatura y el medio de transporte de los ovarios obtenidos *post mortem*, sobre el porcentaje de maduración y fecundación *in vitro* de ovocitos categoría I y II empleando semen refrigerado.



RESUMEN

Existen factores que son necesarios optimizar en las condiciones de transporte de ovarios desde el matadero hasta el laboratorio. Esta investigación evaluó el efecto de la temperatura y el medio de transporte en la maduración y fecundación *in vitro* de ovocitos de alpaca. Se recolectaron 60 ovarios de alpacas (*Vicugna pacos*) del matadero de Ayaviri y se transportaron hasta el laboratorio, se utilizaron dos temperaturas 5 y 15 °C para el almacenamiento y dos medios de transporte, con y sin solución salina al 0.9 %, los ovocitos fueron seleccionados por categorías y se utilizaron solo los de categoría I y II, se maduraron durante 36 horas después fueron fecundados *in vitro* con semen refrigerado. En el análisis estadístico se utilizó un diseño completo al azar con arreglo factorial. Los resultados indican que las temperaturas de 5 y 15 °C tienen porcentaje similar en la fecundación y maduración *in vitro* de los ovocitos. Sin embargo, el uso de solución salina al 0.9 % como medio de transporte incrementa significativamente el porcentaje de fecundación *in vitro*. Estos hallazgos sugieren que el uso de solución salina al 0.9 % como medio de transporte contribuye en la preservación y la viabilidad de los ovocitos, mientras que la temperatura puede ser de 5 o 15 °C. Esta investigación aporta conocimientos para mejorar los protocolos de transporte de ovarios, y uso de ovocitos en la fecundación *in vitro* de alpacas.

Palabras clave: *Camélidos, fecundación in vitro, matadero, ovocitos, solución salina.*



ABSTRACT

The conditions under which ovaries are transported from the slaughterhouse to the laboratory require optimization of several factors. This research evaluated the effect of temperature and transport medium on alpaca oocyte maturation and in vitro fertilization. 60 alpaca ovaries (*Vicugna pacos*) were collected from the Ayaviri slaughterhouse and transported to the laboratory. Two temperatures, 5 and 15 °C, were used for storage and two means of transport, with and without 0.9 % saline solution. The oocytes were selected according to categories. Only categories I and II were used. They were matured for 36 hours and then fertilized in vitro with refrigerated sperm. The statistical analysis used was a complete randomized design with factorial arrangement. The results indicate that ovarian transport temperatures of 5 and 15 °C have a similar percentage of in vitro fertilization and oocyte maturation. However, using 0.9 % saline solution as a transport medium significantly increased the percentage of in vitro fertilization. These results suggest that using 0.9 % saline as a transport medium contributes to the preservation and viability of oocytes, while the temperature may be 5 or 15 °C. This research provides knowledge to improve ovarian transport protocols and the use of oocytes for in vitro fertilization in alpacas.

Keywords: *Camelids, in vitro fertilization, slaughterhouse, oocytes, saline solution.*



CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción del problema

Más de 60 comunidades, es decir, un total de 3 300 familias, se dedican a la crianza mixto familiar de alpacas, la cual se realiza con escasos conocimientos de mejoramiento genético, bajo cuidado sanitario y en pastizales alto andinos con baja soportabilidad de carga animal, lo cual conlleva a que la tasa de natalidad baje y la tasa de mortalidad se incremente², resultando de manera directa o indirecta en baja producción y calidad de la fibra de alpaca lo cual genera menor ingreso económico a estas familias. La biotecnología reproductiva como la fecundación *in vitro* podría permitir una mejora de la genética de estos animales; sin embargo, para ello es necesario estandarizar procesos básicos de esta técnica específicamente para alpacas, siendo uno de estos el transporte de los ovarios desde los mataderos⁶. Las muestras de ovarios que se consiguen son escasas y están sujetas a la disposición de los compradores de alpacas para la venta de carne mas no con fines de investigación, por lo tanto, es fundamental contar con datos que sirvan para estandarizar la colecta de muestras de ovario considerando la temperatura y medio de transporte⁷, ambos parámetros tienen una repercusión importante en el porcentaje de maduración *in vitro* de ovocitos⁷. En alpacas, algunos estudios mencionan que a medida que aumenta el tiempo de transporte es menor el porcentaje de maduración a 0 horas puede alcanzar un 47.9 %, a las 16 horas con temperatura de 22-25 °C alcanza una maduración de 32.7 % mucho mayor que a temperaturas de 12-15 °C que solo alcanza un 12.2 %⁸, respecto a la temperatura y medio de transporte se considera que la categoría del complejo cúmulo ovocito (COC) está relacionado directamente en el potencial de maduración del ovocito para esto los ovocitos podrían estar en medio de transporte de solución salina al 0.9 % a temperaturas de entre 30 y 37 °C por un tiempo de 8 horas sin que se llegue a afectar la calidad del ovocito ni los procesos de maduración y fecundación *in vitro*⁹. Las características del ovario pueden influir en la respuesta de la maduración *in vitro*, ya que los folículos más grandes pueden proporcionar un microambiente apropiado para el ovocito lo que conlleva a un mejor desarrollo embrionario², En este contexto, es importante tener estándares para la colección de muestras de ovarios considerando la temperatura y medio de transporte para poder lograr exitosamente la maduración *in vitro*,



fecundación *in vitro* u otros estudios que contribuyan a mejorar la calidad genética de las alpacas y contribuir en el desarrollo de las zonas alpaqueras.

1.2 Enunciado del Problema

1.2.1 Problema general

¿Cuál es el efecto de la temperatura y medio de transporte de ovarios de alpaca sobre el porcentaje de maduración y fecundación *in vitro* de ovocitos empleando semen refrigerado?

1.2.2 Problemas específicos

- ¿Cuál es el efecto de la temperatura y medio de transporte de ovarios de alpaca sobre el porcentaje de maduración *in vitro* de ovocitos categoría I y II empleando semen refrigerado?
- ¿Cuál es el efecto de la temperatura y medio de transporte de ovarios de alpaca sobre el porcentaje de fecundación *in vitro* de ovocitos categoría I y II empleando semen refrigerado?

1.2.3 Justificación de la investigación

La fecundación *in vitro* de alpaca representa una alternativa para lograr una mejor calidad genética y cantidad en los rebaños. En la actualidad, pese al uso de nuevas tecnologías y técnicas, no se logran los resultados esperados ya que persisten los problemas de baja tasa de natalidad y la pérdida de calidad genética, teniendo en cuenta el largo tiempo de intervalo generacional para poder observar resultados.

Utilizar biotecnologías reproductivas acorta el periodo de tiempo para lograr resultados del mejoramiento del material genético. En el caso de los camélidos sudamericanos, esto tiene mayor importancia porque el uso de la tecnología reproductiva es limitado y su estudio a diferencia de otras especies domésticas es poco considerado. Por este motivo, lograr estandarizar el método de transporte de ovarios de alpaca procedentes de matadero contribuye en la implementación de biotecnologías como la maduración y fecundación *in vitro* de ovocitos.

Conocer la temperatura y medio adecuado de transporte de ovarios, podría minimizar los riesgos en la maduración de los ovocitos en laboratorio. Estos



parámetros son importantes debido a que influyen directamente en la calidad de los ovocitos². En este sentido, es necesario conocer si hay algún efecto en la temperatura y el medio de transporte de ovarios de alpaca y si estos producen mejores porcentajes de maduración y fecundación *in vitro* de los ovocitos.



CAPÍTULO II

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivos de la investigación

2.2.1 Objetivo general

Analizar el efecto de la temperatura y el medio de transporte de ovarios de alpaca sobre el porcentaje de maduración y fecundación *in vitro* de ovocitos empleando semen refrigerado.

2.2.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la temperatura a 5 y 15 °C con y sin solución salina al 0.9 % como medio de transporte de ovarios de alpaca sobre el porcentaje de maduración *in vitro* de ovocitos categoría I y II empleando semen refrigerado.
- Estimar el efecto de la temperatura a 5 y 15 °C con y sin solución salina al 0.9 % como medio de transporte de ovarios de alpaca sobre el porcentaje de fecundación *in vitro* de ovocitos categoría I y II empleando semen refrigerado.

2.2 Hipótesis de la investigación

2.2.3 Hipótesis general

El traslado de ovarios de alpaca a 15 °C en medio de transporte produce mejor porcentaje de maduración y fecundación *in vitro* de ovocitos empleando semen refrigerado.

2.2.4 Hipótesis específicas

- El transporte de ovarios de alpaca a temperatura de 15 °C produce mejor porcentaje de maduración y fecundación *in vitro* de ovocitos categoría I y II empleando semen refrigerado.
- El transporte de ovarios de alpaca con solución salina al 0.9 % como medio de transporte produce mejor porcentaje de maduración y fecundación *in vitro* de ovocitos categoría I y II empleando semen refrigerado.



2.3 Operacionalización de variables

Tabla 1. Operacionalización de temperatura, medio de transporte de ovarios, maduración y fecundación *in vitro* de alpacas (*Vicugna pacos*)

Tipo de variable	Variable	Nivel de variable	Indicador/UM
Independiente	Medio de transporte	Con y Sin medio de transporte	Presencia o ausencia
	Temperatura	5 y 15 °C	°C
Dependiente	Maduración <i>in vitro</i>	Ovocitos categoría I y II	Porcentaje
	Fecundación <i>in vitro</i>	Ovocitos categoría I y II	Porcentaje



CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

3.1 Antecedentes

3.1.1 Antecedentes Nacionales

- a) En el estudio de Castro *et al.*, examinaron la maduración de los ovocitos de alpaca tomados de folículos pequeños y grandes para realizar la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) después de la maduración *in vitro*, previamente los ovarios fueron recolectados del matadero y se transportaron al laboratorio en solución salina al 0,9 % durante 22 horas a 10 °C. Los ovocitos se obtuvieron por aspiración folicular, mientras que los ovocitos de folículos pequeños se obtuvieron mediante la realización de secciones superficiales en la corteza del ovario. Se seleccionaron AOC de las categorías I y II y se sometieron a IVM durante 32-36 h a 38,5 °C. La ICSI se realizó de acuerdo con los protocolos estándar. Se realizó FIV como control para ICSI. Los resultados mostraron que el rendimiento de AOC graduados de buena calidad morfológica fue significativamente mayor en los folículos grandes ($2,1 \pm 0,8$) que en los pequeños ($1,2 \pm 0,7$). Sin embargo, tras la IVM no se observaron diferencias significativas en la tasa de metafase II (18,1 vs 22,1 %) y ovocitos degenerados (48 vs 57 %). Posteriormente, el 15 % de las FIV y ninguna ICSI alcanzaron la etapa de 4 a 8 células. Se concluyó que los folículos más grandes producen mayor cantidad de ovocitos de alta calidad morfológica, y los ovocitos de folículos más pequeños pueden alcanzar IVM muy similar⁵.
- b) En un reporte de Landeo *et al.*, compararon la calidad morfológica y el desarrollo *in vitro* de los COC de alpacas vivas y alpacas beneficiadas, los ovarios fueron transportados al laboratorio en solución salina tamponada con fosfato a 37 °C, complementado con penicilina (100 UI/mL) y estreptomicina (100 µg/mL) dentro de 1 hora después del beneficio, los ovocitos se recuperaron por aspiración folicular en alpacas beneficiadas en un matadero local, y aspiración folicular guiada por ecografía transrectal (o recogida de óvulos, OPU), 4 días después de la



administración del protocolo de superestimulación ovárica (200 UI eCG). Los ovocitos se clasificaron en categoría I a III se maduraron *in vitro* durante 26 horas y luego se fecundaron *in vitro* durante 20 h utilizando espermatozoides epididimales frescos. Los presuntos cigotos de ambos grupos se cultivaron *in vitro* durante 7 días. La proporción de ovocitos recuperados sobre el número total de folículos puncionados fue similar entre los grupos, pero el número medio de ovocitos recogidos de ovarios individuales fue mayor en los ovarios de matadero. Se obtuvo un porcentaje significativamente mayor de ovocitos de baja calidad (categoría III y IV) y un porcentaje menor de ovocitos de categoría I usando OPU. Concluyó que el porcentaje de recuperación y la calidad morfológica de los ovocitos es significativamente mayor cuando los folículos se extraen por técnica de aspiración folicular de ovarios, sin embargo, se observó un potencial de desarrollo estadísticamente más alto en los ovocitos recolectados por OPU de donantes vivos de alpaca¹⁰.

- c) Laines *et al.*, comparo dos medios de cultivo en la producción de embriones *in vitro*. El protocolo utilizado previamente fue la recolección de 492 ovarios que fueron transportados a 10.52 °C en solución salina al 0.9 % más gentamicina, se recuperó 2 142 ovocitos de categoría I, II y III. Estos fueron madurados *in vitro* por 32 horas y fecundados *in vitro* durante 18 horas utilizando espermatozoides de epidídimo, concluyó en su investigación que, el medio de cultivo KSOMaa y SOFaa pueden ser utilizados en la producción de embriones *in vitro* de alpacas, debido a que la calidad embrionaria en ambos medios no mostraron diferencias significativas¹¹.
- d) En la investigación de Ruiz *et al.*, evaluaron el efecto que tiene el tiempo de maduración *in vitro*, la selección espermática y la tensión de oxígeno respecto al desarrollo del embrión de las alpacas, las muestras de ovarios se colectaron del matadero, se transportaron al laboratorio en solución salina tamponada con fosfato a 35 °C suplementado con penicilina (100 UI/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). Fueron madurados *in vitro* en TCM-199 durante 24, 28 y 32 horas a temperatura de 38.5 °C con humedad y 5 % de CO₂ en el medio ambiente, como resultado se obtuvo que el porcentaje de ovocitos que alcanzaron la etapa M-II fueron más altas después de las 32 horas de maduración *in vitro*, no se observó que exista interacción o se afecten los resultados por la selección de espermatozoides o la tensión de oxígeno¹².



- e) Garcia *et al.*, evaluaron el efecto de la yema de huevo fresca (YHF) y la yema en polvo (YHP) esto sobre la motilidad, viabilidad, integridad funcional que tiene la membrana plasmática y la tasa que tiene de preñez comparado con semen fresco y refrigerado para lo cual se tomaron muestras de 30 eyaculados de 5 alpacas por el método de poscópula y se distribuyeron en tris-glucosa y en glicerol 5 % y usando los tipos de yema de huevo a una concentración de 20 % esta muestra se diluyó y separó en alícuotas y se mantuvo en 15 °C durante 8 horas y otro tratamiento a 5 °C durante 24 horas, posteriormente se inseminó a 180 alpacas con este semen, los resultados que se obtuvieron indican que la yema de huevo en polvo se puede emplear como una alternativa de la yema de huevo fresco en los diluyentes de conservación y de refrigeración del semen de alpacas¹³.
- f) Pérez *et al.*, evaluaron el efecto que tiene el cultivo *in vitro* e *in vivo* de cigotos de alpacas, se utilizaron 226 ovarios, que se obtuvieron del matadero, estos fueron transportados dentro las 6 horas siguientes al laboratorio, las muestras fueron acondicionadas en bolsas pequeñas de polietileno que contenían solución fisiológica a temperaturas de 32 a 35 °C, suplementado con 0.03 g/ml de Combipen, estas bolsas con los ovarios se acondicionaron dentro de un termo de agua caliente. En el laboratorio fueron aspirados los folículos de 2-6 mm, madurados con TCM 2 520 y fecundados en FERT TALP, se concluyó que tanto el cultivo *in vitro* como *in vivo* de cigotos que fueron producidos *in vitro* se pueden utilizar en producción de embriones de alpaca¹⁴.
- g) Vasquez *et al.*, evaluaron la cantidad y calidad de ovocitos de alpacas y llamas obtenidos por métodos de aspiración folicular y slicing de los ovarios. Los ovarios se recolectaron del camal después del beneficio, fueron colectados en bolsas de polietileno que contenían solución salina (0.9 % NaCL) a 35 °C dentro de un termo que fue transportado al laboratorio por 5 a 6 horas. Los ovocitos se clasificaron según su categoría. El promedio de ovocitos por ovario para métodos fue altamente significativo, siendo por aspiración folicular de 4.50 ± 2.06 y 3.10 ± 1.68 y por corte de 10.00 ± 7.01 y 8.25 ± 4.96 en alpacas y llamas respectivamente. El promedio de ovocitos por ovario fueron similares para alpacas de 7.25 ± 5.81 y llamas de 5.67 ± 4.49 , según la ubicación del ovario derecho e izquierdo fueron 6.75 ± 4.70 , 7.75 ± 6.84 y 6.45 ± 5.02 , 4.90 ± 3.86 respectivamente. El porcentaje de recolección ovocitaria fue superior por slicing 102.04 y 81.68 % que por aspiración folicular

62.07 y 68.13 % para alpacas y llamas, respectivamente. En la evaluación de ovocitos fueron similares entre métodos. Los porcentajes de ovocitos aptos y no aptos para la maduración son similares entre aspiración folicular 71.11, 28.89 y 69.35, 30.65 % y slicing 61.00, 39.00 y 64.85, 35.15 % para alpacas y llamas, respectivamente. Se concluyó que la mayor cantidad de ovocitos recuperados fue por el método de slicing que por aspiración folicular y con respecto a la calidad no se encontró el efecto del método sobre la categoría de los ovocitos¹⁵.

- h) Ruiz *et al.*, el estudio fue diseñado para comparar la división y el porcentaje de blastocistos de ovocitos de alpacas y llamas madurados *in vitro* después de la activación química. Los ovarios de alpaca y llama se recolectaron en un matadero y se transportaron dentro de 2 a 3 horas al laboratorio. Los ovarios se lavaron en solución salina al 0,9 %, la técnica de recuperación de ovocitos fue por aspiración folicular y se clasificaron según su categoría. Solo los COC de categoría 1 y 2 se maduraron *in vitro* durante 26-28 horas en medio TCM 199 a 39 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ en aire humidificado. Después de la maduración *in vitro*, los ovocitos se despojaron de las células del cúmulo mediante agitación vorticial durante 2 minutos en solución de mSOF-HEPES al 0,1 % de hialuronidasa. Se recolectó un mayor porcentaje de COC de categoría 3 de ovarios de alpaca que de llama; sin embargo, no hubo diferencias significativas en las categorías restantes de AOC entre especies. Se activaron químicamente un total de 224 y 240 ovocitos maduros de alpaca y llama, respectivamente. El porcentaje de desarrollo de división, mórula y blastocisto no difirió entre los grupos. Concluyó que los ovocitos de alpaca y llama pueden activarse eficazmente después de una incubación secuencial con ionomicina 5 M y 6-DMAP 2 mM/citocalasina B 12,5 M, lo que da como resultado porcentajes de desarrollo embrionario *in vitro* adecuados que podrían usarse para evaluar la viabilidad y funcionalidad de los ovocitos¹⁶.
- i) En el reporte de Huanca *et al.*, evaluaron ovocitos de alpacas y el efecto del tiempo de cultivo sobre el porcentaje de maduración y la división post fecundación, las muestras de ovarios se obtuvieron de alpacas beneficiadas en el matadero y fueron transportadas a 35 °C en solución salina 0.9 % adicionada con antibiótico y antimicótico, los cuatro tiempos de maduración fueron de 30, 34, 38 y 42 horas. Posteriormente, los ovocitos fueron removidos, lavados con PBS suplementado con 10 % de SFB, 1 mg/ml de hialuronidasa y fijados en solución de etanol con ácido



acético. Los ovocitos fueron teñidos con 1 % de orceína y examinados bajo el microscopio para determinar la maduración nuclear. En el otro tratamiento los ovocitos fueron cultivados bajo las mismas condiciones y fecundados con espermatozoides obtenidos de epidídimos. Sus resultados sugieren que los ovocitos de alpacas necesitan de 38 a 42 horas para obtener estadios de metafase II¹⁷.

- j) Arriaga *et al.*, evaluaron el efecto de temperaturas correspondientes a 12-15 y 22-25 °C, y el tiempo en el que se tiene que almacenar de 0 y 16 horas los ovarios de alpacas sobre el porcentaje de maduración y división post fecundación *in vitro*, las muestras de ovarios recolectadas se tomaron de alpacas adultas que fueron sacrificadas en el matadero de Pilpicacha en Huancavelica, estas muestras se transportaron al laboratorio en solución salina al 0.9% con temperatura de 35 °C. Los ovarios fueron distribuidos al azar en los tratamientos Control (0 h), T1 (16 h a 12-15 °C) y T2 (16 h a 22-25 °C). Los ovocitos fueron madurados en medio TCM 199 por 40 horas. Posteriormente, los presuntos cigotos fueron colocados en medio de cultivo KSOM por 72 h posfecundación *in vitro* y luego transferidos a medio SOF. Se obtuvo un porcentaje de maduración nuclear en metafase II de 47.9, 12.2 y 32.7 %, un porcentaje de división de 46.2, 8.1 y 32.7 % y un porcentaje de blastocistos de 33.3, 14.2 y 20.6 % para los grupos Control, T1 y T2, respectivamente. El almacenamiento de ovarios de alpaca a 22-25 °C por 16 h (T2) permite mantener la calidad de los ovocitos y obtener un mayor porcentaje de maduración y de división posfecundación *in vitro*⁸.
- k) En el estudio de Gomez *et al.*, evaluó métodos de recuperación de COCs de ovarios *post mortem* en mataderos, para maximizar la cantidad de ovocitos de buena categoría para la IVM y FIV. Se recolectaron ovarios de alpacas vacías en edad reproductiva, a dos horas del beneficio, se colocaron en una caja térmica en solución fisiológica al 0.9 % a 30-35 °C, al que se agregó penicilina G potásica; luego fueron transportados en un intervalo máximo de 4 horas al laboratorio. Los ovarios pueden permanecer en solución salina a temperatura de 30 a 37 °C hasta 8 horas sin llegar a afectar la calidad de los ovocitos en los procesos de IVM y FIV. Su objetivo fue comparar la cantidad de COCs aptos, COCs aptos por ovario, y la proporción de COCs aptos por lado de ovario, utilizando técnicas de aspiración folicular, slicing y disección-ruptura folicular del ovario. Concluyó que de folículos de 2-6 mm en la superficie del ovario, la disección ruptura folicular proveen mayores cantidades



de COCs aptos para la IVM y FIV que el slicing y la aspiración folicular; así mismo existe mayor número de COCs por ovario y COCs aptos por ovario que por los otros métodos; ambos ovarios de la alpaca producen similares porcentajes de COCs aptos⁹.

- l) Gomez *et al.*, en su investigación compara las técnicas de slicing y aspiración folicular para determinar cómo estas afectan en la categorización, calidad y rendimiento de los ovocitos recuperados de ovarios de bovino criollo *post mortem*. Mediante estas técnicas se pretende incrementar el número total de ovocitos recuperados. Para ello se recolectaron 200 ovarios que fueron transportados en solución fisiológica al 0,9 %, a temperatura entre 30 y 35 °C, hasta el laboratorio. Después de su investigación, concluyó que utilizando las técnicas de slicing y aspiración folicular no existe efecto en la categorización de ovocitos. Asimismo, proveen similares categorías de ovocitos. Del mismo modo, con las técnicas descritas se recuperaron similar cantidad de ovocitos por ovario. Por tanto, es posible utilizar cualquiera de estas técnicas de recuperación, pero los ovocitos deben ser tomados de folículos de 2-8 mm de diámetro y solamente de aquellos que se encuentren en la superficie del ovario¹⁸.
- m) En el estudio de Morante *et al.*, se elaboró una base de datos de producción y reproducción donde la gestación y el apareamiento se dan de forma natural, después se realiza evaluación genética para la selección, y posteriormente se emplea la transferencia de embriones para poder aumentar la intensidad de la selección, su objetivo es convertirse en una finca con núcleo de selección, realizar investigación genética y de reproducción. El programa en Pacamarca, buscó extender sus avances tecnológicos a otras pequeñas comunidades rurales organizando capacitaciones para mejorar el rendimiento de alpacas, así como la parte técnica y científica¹⁹.
- n) Ramos *et al.*, su objetivo fue madurar y fecundar *in vitro* los ovocitos de alpacas. Los ovarios fueron colectados en mataderos y colocados en un termo a temperatura de 37 °C para su traslado hacia el laboratorio. Los complejos cúmulos-ovocito (COC) se recuperaron por técnica aspiración folicular y se clasificaron en categorías I y II. La maduración *in vitro* se realizó en TCM-199 suplementado con suero fetal bovino (FCS) al 10 %, hormona folículo estimulante (FSH) 0.02 UI/ml, piruvato de sodio (0.2 mM), gentamicina (50 µg/ml), 17β-estradiol (1µg/ml), y en FIV



suplementado con hCG (10 UI/ml) y 17β -estradiol (99 μ g/ml). Se analizaron los ovocitos después de 26 horas de cultivo. La fecundación *in vitro* fue realizada en Fert-TALP suplementado con suero albúmina bovina (BSA), fueron evaluados a partir de las 48 horas por la segmentación del cigoto. La tasa de maduración no mostró diferencia significativa entre el número de ovocitos madurados en TCM-199 ($61/85 = 71.76\%$) e IVF ($31/44 = 70.45\%$) en relación a los COC de categoría I y II. El porcentaje de fecundación no mostró diferencia significativa en TCM-199 ($13/61 = 21.31\%$) e FIV ($6/28 = 21.43\%$). Sugiere que el sistema de cultivo *in vitro* de ovocitos de alpaca en FIV se puede emplear como herramienta biotecnológica para el manejo reproductivo ya que permite conseguir ovocitos maduros y fecundados potencialmente viables²⁰.

- o) Huanca *et al.*, evaluó el efecto de diferentes temperaturas de transporte 35 °C y 4 °C sobre la calidad morfológica de ovocitos colectados de ovarios de alpaca. Se formaron dos grupos. El grupo G1(n=10) fueron ovarios colocados en solución salina a 35 °C y el grupo G2 (n=10) a ovarios colocados en solución salina a 4 °C. Fueron transportados al laboratorio en un lapso de 18 horas. Para la recuperación de ovocitos se utilizó la técnica de aspiración folicular. Se evaluó la calidad morfológica y diámetro de los ovocitos colectados. Los resultados en el G1 la calidad morfológica 54 % de ovocitos de categoría I y II, diámetro de los ovocitos 0.17 ± 0.03 mm, 3.5 ± 1.7 ovocitos colectados de 5.1 ± 2.3 folículos > 3mm; y para G2: calidad morfológica 36 % de ovocitos de categoría I y II. Sus resultados sugieren una mejor calidad morfológica en ovocitos que fueron transportados en suero fisiológico a 35 °C respecto a los transportados a 4 °C²¹.

3.1.2 Antecedentes Internacionales

- a) Evecen *et al.*, examinó los efectos de dos temperaturas de transporte a 37 °C - 4 °C, y el almacenamiento en frío de los ovarios durante 24 horas sobre la apoptosis de las células del cúmulo y las tasas de maduración de los ovocitos *in vitro*. Se recolectaron ovarios de 15 animales domésticos ovariectomizados que se mantuvieron y transportaron al laboratorio en solución salina tamponada con fosfato a 37 °C y 4 °C. Los COC seleccionados se maduraron durante 48 horas a 38 °C en placas de Petri de cuatro pocillos que contenían 500 μ L de medio de oviducto modificado (mSOF) bajo aceite mineral en una incubadora de CO₂ al 5 % con casi



100 % de humidificación. Los resultados de este estudio sugieren que las células del cúmulo de ovocitos están parcialmente expuestas a la apoptosis durante el transporte a temperatura cálida o fría, el almacenamiento de ovarios durante 24 horas a 4 °C causa apoptosis de las células del cúmulo a tasas mucho más altas y el almacenamiento de ovarios durante 24 horas a 4 °C afecta negativamente la tasa de IVM²².

- b) Según Lorenzo *et al.*, en la selección de ovocitos de porcinos es fundamental la técnica que se utilizara para obtener el COC ya que aparentemente repercute en la calidad de los ovocitos, el objetivo fue comparar la técnica de slicing y aspiración folicular para determinar el porcentaje de la maduración meiótica ovocitaria y la apoptosis temprana, así como tardía en el COC. Los ovarios fueron trasladados dentro de las 3 horas posteriores al beneficio de los animales manteniendo la temperatura entre 28-33 °C. En el laboratorio fueron lavados con NaCl 0,9 % a 37 °C y posteriormente se hizo la comparación de ambas técnicas. Los resultados de la aspiración folicular tuvieron mayor porcentaje significativo en la maduración nuclear ovocitaria pero esta técnica fue restringida para los folículos antrales que son grandes, se recuperaron menos cantidad de ovocitos por cada ovario que por el método slicing²³.
- c) Leisinger *et al.*, evaluó la edad de alpacas adultas frente a jóvenes, el tamaño folicular y la suplementación de medios para poder determinar los factores que intervienen en la maduración *in vitro* de los ovocitos, se consideraron como jóvenes a menores de 10 años y adultas a mayores de 11 años, se llegó a la conclusión que la edad no influye en los resultados y que la adición de FBS a los medios de maduración mejora el porcentaje de maduración *in vitro*, los ovocitos recolectados de folículos antrales mayores a 2 milímetros de alpacas adultas no tuvieron diferencia significativa²⁴.
- d) En el estudio de Gomes *et al.*, evaluaron la eficiencia de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y medio esencial mínimo (MEM) en el transporte de folículos antrales y preantrales a diferentes temperaturas e intervalos de incubación, se cortaron 19 fragmentos de los cuales uno se fijó en solución Bouin y los demás en PBS y MEM a temperaturas de 4, 20 y 39 °C, durante 4, 12, 24 horas. Posteriormente todos fueron fijados en solución Bouin durante 24 horas para



después someterlos a un análisis histológico estándar. Los resultados indican que el 43 % de folículos antrales son morfológicamente normales cuando se mantienen en MEM a 4 °C durante 4 horas. Se concluyó que los folículos se conservan con éxito en fragmentos de ovario a 4 °C en solución PBS durante un máximo de tiempo de 4 horas²⁵.

- e) Según Kershaw *et al.*, el procedimiento para obtener espermatozoides del epidídimo consiste en hacer cortes finos con un bisturí estéril y los espermatozoides se dejan nadar durante 30 minutos en 4 ml de agua tibia a 37 °C. Después de la recolección, se centrifugaron a 300 g durante 5 min a temperatura ambiente y se retira el sobrenadante. Después, los espermatozoides se suspendieron en PBS-BSA o en plasma seminal que contenía 0,1 % de BSA, 7,5 mg/ml de penicilina y 5 mg/ml de estreptomycin, pero sin PBS a 1000 ± 106 espermatozoides/ml y se evaluó la motilidad. Solo se utilizaron muestras con al menos 100 106 espermatozoides recuperados por par de testículos y con espermatozoides que mostraban una motilidad superior al 50 % después de la centrifugación²⁶.
- f) Robledo *et al.*, evaluó el porcentaje de IVM, de FIV y el desarrollo embrionario (DIV) *in vitro* en ovocitos de oveja madurados en dos medios de cultivo. Los ovarios fueron obtenidos de ovejas beneficiadas en matadero y transportados al laboratorio dentro de las 2 horas siguientes en solución salina al 0.9 %, a una temperatura de 25-30 °C. Los COC se obtuvieron, por técnica aspiración folicular. Un total de 120 COC de categoría I y II fueron distribuidos aleatoriamente en dos medios de maduración. El desarrollo y morfología de embriones fue evaluado a 2, 4, 5 y 6 días de iniciado el cultivo, el porcentaje final de producción embrionaria se determinó al día 8 post FIV. El porcentaje de IVM no mostró diferencias significativas entre los dos tratamientos (73.3 vs 71.4 % en HECM-9 y TCM-199, respectivamente). El porcentaje de FIV fue diferente entre tratamientos, observando una mejor respuesta de los ovocitos madurados en HECM-9 respecto a los madurados en TCM-199 (47.4 vs 28.6 %, respectivamente). El porcentaje de DIV fue mayor con los ovocitos madurados en HECM-9 respecto a los madurados en TCM-199 (26.3 vs 7.9 %, respectivamente). El medio HECM-9 favoreció el porcentaje de fecundación y desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos de ovinos en comparación con el medio TCM-199²⁷.



- g) Ratto *et al.*, hace la comparación de la respuesta folicular ovárica, así como el porcentaje de recolección del COC y el estado de maduración de los COC recolectados de alpacas después del tratamiento con dos protocolos de superestimulación diferentes. Los ovarios se expusieron quirúrgicamente y los COC se recolectaron mediante aspiración con aguja calibre 21 unida a una jeringa estéril de 10 ml que contenía solución PBS suplementada con 100 UI/ml de penicilina, estreptomicina 100 g/ml, y albúmina de suero bovino al 0,3 % (BSA), los tratamientos con FSH y eCG fueron igualmente efectivos para la superestimulación ovárica y la recolección de ovocitos. Se recolectaron COC de más del 80 % de los folículos aspirados mediante laparotomía²⁸.
- h) Wani *et al.*, realiza esta investigación para conocer la cinética de la maduración nuclear *in vitro* y el efecto de almacenamiento de ovarios de camello dromedario, se recolectaron del matadero ovarios de camello con historial reproductivo desconocido, se llevaron al laboratorio en un termo que contenía solución salina normal tibia (NSS) a 37 °C. Se maduraron *in vitro* en un tiempo de 4 a 48 horas con intervalos de 4 horas, después de 8 y 16 h de maduración, la mayor proporción de ovocitos (42 y 41 %) se encontraban en estadio de diacinesis (DK) y metafase 1 (MI), respectivamente. Las proporciones de ovocitos que alcanzaron el estadio metafase II (M-II) en 32 (42 %), 36 (45 %), 40 (49 %), 44 (52 %) y 48 horas (46 %) de cultivo no fueron diferentes entre sí. Se concluyó en esta investigación que los ovocitos de dromedario requieren entre 32 a 44 horas de cultivo *in vitro* para poder tener un número adecuado de ovocitos en un estado de M-II, aun teniendo estos datos, se necesitan más estudios para encontrar el tiempo de maduración más adecuado. Los ovocitos se pueden recolectar y almacenar en solución salina normal a temperatura ambiente durante 12 horas sin tener efecto significativo en relación a la maduración nuclear de los ovocitos²⁹.
- i) Ratto *et al.*, estudió los COC para lo cual, recolectaron ovarios de llama de los mataderos en un termo que contenía solución PBS suplementado con penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 mg/ml) y se cultivaron *in vitro* durante 28, 30 y 36 horas a temperatura de 39 °C en 5 % de CO₂, La mayoría de los COC se clasificaron en las categorías I y II, la proporción que experimentó maduración nuclear (MII) fue del 78, 81 y 80 %, a las 28, 30 y 36 horas respectivamente. Se

concluyó, que los ovocitos de llama alcanzan la M-II después de 28 horas de maduración *in vitro*³⁰.

3.2 Marco teórico

3.2.1 Biotecnología reproductiva

La biotecnología reproductiva como la FIV o la producción de embriones *in vitro*, son una importante herramienta para lograr mejorar la producción animal en la industria ganadera². Se emplea la biotecnología reproductiva en especies domesticas de gran interés económico, para poder contribuir en la mejora genética animal a pesar de que estos estudios sean limitados en cuanto a información⁷. El utilizar técnicas de la biotecnología reproductiva como son la sincronización folicular, súper estimulación ovárica, recuperación y transferencia embrionaria, la maduración ovocitaria, las técnicas de reproducción asistida (FIV, ICSI), la transferencia nuclear y la criopreservación embrionaria³¹, puede lograr aumentar rápidamente el número de animales genéticamente superiores así se lograría incrementar la cantidad de animales (núcleo) previamente seleccionados por sus características morfológicas, morfométricas, por su calidad y cantidad respecto a los productos que ofrecen¹¹.

Los fines para los que se utilizan hoy en día a los camélidos no son solo de transporte y carne, sino que existe gran apoyo económico en la región, a partir de esto toma mayor importancia la eficacia reproductiva y surgen las tecnologías de reproducción asistida (ART)²².

La combinación de distintas tecnologías reproductivas hace posible que se pueda utilizar germoplasma ya sea congelado o almacenado en bancos de recursos genéticos, esto con fines de poder lograr medidas de conservación para que se pueda mantener principalmente la diversidad genética en especies que estén amenazadas, por lo tanto, es necesario el apoyo interdisciplinario y tener objetivos muy claros para poder elegir entre el gran número de especies que necesitan la atención de los científicos³², también es importante el conocimiento de la fisiología reproductiva de estas especies además de la aplicación de procedimientos reproductivos tecnológicos avanzados y tener enfoques de monitoreo no invasivo ya que es indispensable para que la reproducción sea exitosa²³. Los estudios que se realizan en técnicas de biotecnología reproductiva son mínimas en especies como CSA debido a las características reproductivas complejas de esta especie los avances son lentos³³.

3.2.2 Fisiología reproductiva de la alpaca

Las características que presentan a diferencia de otros ungulados es que la ovulación se da de forma inducida y requieren del apareamiento para que pueda existir la ovulación del folículo dominante, existen otros factores externos que también intervienen como son los estímulos físicos, olfativos, visuales y auditivos³⁴. Las ovulaciones sin copulación se describen como ovulaciones espontaneas y no son muy frecuentes ya que solo suceden en un 5 % de las hembras³⁴. Las hembras que no se han apareado tienen renovación continua de folículos (ondas foliculares). Una emergencia de folículos es seguida por la emergencia sincronizada de un grupo de folículos en la zona del antro, los cuales crecen hasta 4-5mm. Uno de estos se desarrollará y será el folículo dominante, y los demás folículos sufrirán regresión por atresia. Existe una relación inversa entre el diámetro del folículo dominante y el número de folículos del antro. El folículo dominante secreta inhibina y así regula el número y diámetro de los folículos presentes en ambos ovarios³⁴.

Las alpacas presentan celo posparto a las 24 horas, el celo es continuo mientras no se haga un buen servicio, en el caso de un adecuado servicio la alpaca rechaza al macho a los 5 días después a la ovulación³⁵.

3.2.3 Anatomía del ovario de alpaca

La alpaca tiene útero bicornes, el cérvix tiene 2-3 pliegues de mucosa y forman anillos espirales y el orificio externo del cérvix protruye hacia una vagina de 15-20 cm de longitud. Los cuernos uterinos tienen 8 cm de largo con la punta de los cuernos redondeados y localizados en dirección caudal. El cuerno uterino izquierdo es más grande que el derecho y puede observarse mejor en hembras preñadas ya que un 98% de las gestaciones ocurren ahí³⁴, esta particularidad también se presenta en guanacos. La anatomía de los ovarios de las alpacas es globular (1,3 – 1,9 x 0,9 – 1,3 x 0,9 – 1,3 cm) el tamaño puede variar según las estructuras que estén presentes en los ovarios, el peso de cada ovario puede variar entre 1,9 y 2,4 gramos, en hembras nulíparas los ovarios se encuentran aplanados lateralmente y pueden tener superficie irregular, esto porque hay numerosos folículos presentes. En las alpacas adultas se observan diversos folículos que varían en tamaño de 2 a 5 milímetros, en la superficie del ovario normal maduro. Por el método de palpación transrectal no es fácil para poder identificarlos y más aún en animales jóvenes, pero si se puede observar visualmente mediante la ultrasonografía cuando alcanza un tamaño de 3 mm².

3.2.4 Tamaño del folículo

El criterio más utilizado para obtener ovocitos competentes, es el tamaño del folículo del que se recuperaron los ovocitos ya que ganan competencia en las últimas etapas de la fase folicular⁵. En camélidos, observaron que los niveles elevados de glucosa, calcio y sodio se asociaron con tamaños de folículos más grandes³⁶, también se descubrió que existe correlación entre el tamaño del folículo y la competencia de desarrollo. Por lo tanto, los folículos más grandes proporcionan un microambiente apropiado para el ovocito⁵. Las investigaciones muestran que los folículos mayores de 18 mm en el momento de la recuperación tienen ovocitos consistentemente maduros con un mayor porcentaje de fecundación, los folículos pequeños todavía son capaces de contener ovocitos maduros, pero su porcentaje de fecundación anormal o nula es alta, los ovocitos recuperados con lavado aún son capaces de producir embriones con plena competencia de desarrollo³⁷. Los factores en combinación como son el tamaño del folículo, la edad del animal y la composición del medio están relacionados, tienen un profundo impacto en los porcentajes de maduración de los ovocitos *in vitro*¹⁶.

3.2.5 Factores que influyen en la maduración y fecundación *in vitro*

Existen factores internos propios del organismo de la hembra como la edad, se ha demostrado que la edad avanzada ocasiona disminución significativa en la competencia de los ovocitos a medida que incrementa también disminuye la calidad y cantidad de ovocitos²⁴, lo que reduce las posibilidades de lograr madurar y fecundar *in vitro*. La reserva ovárica y su bajo potencial de desarrollo influyen en la capacidad para la fecundación y el crecimiento embrionario. Por otro lado, el criterio más común utilizado para obtener ovocitos competentes es el tamaño del folículo del que se recuperarán, debido a que los ovocitos ganan competencia en las últimas etapas de la fase folicular, los niveles elevados de glucosa, calcio y sodio se asocian con folículos grandes que proporcionan un microambiente apropiado para el ovocito⁵. Los factores externos son igual de importantes, algunos de estos factores negativos son el deficiente planteamiento de protocolos para la FIV en alpacas¹⁰, el éxito de un protocolo *in vitro* está en la necesidad de un control preciso de los procesos de maduración, fecundación y el cultivo de los embriones, los factores clave son el tiempo y temperatura de transporte de los ovarios, para poder asegurar la viabilidad y capacidad meiótica y citoplasmática de los ovocitos y su posterior desarrollo embrionario⁴². Teniendo en cuenta la información limitada en camélidos respecto a



la estandarización de protocolos para la producción de embriones *in vitro*¹¹, es preciso, evaluar factores involucrados con el cultivo de los cigotos, para obtener mayor porcentaje de embriones producidos de buena calidad¹⁷. La formulación de medios de cultivo es uno de los factores esenciales que requieren ser evaluados para evitar componentes innecesarios o perjudiciales para los cigotos en desarrollo ya que son sometidos a cultivo *in vitro* en medios suplementados con fuentes que le proporcionen energía, aminoácidos y factores de crecimiento con el fin de asegurar su sobrevivencia y desarrollo embrionario¹¹. Incluso después de la selección homogénea de COCs, solo poco más de la tercera parte alcanzan la maduración citoplásmica completa y poseen la capacidad de producir blastocitos viables para ser transferidos, lo que repercute en que ésta técnica sea menos eficiente en comparación con la producción de embriones *in vivo*²⁷, quizá por la incapacidad del medio de cultivo utilizado durante la IVM para producir señales paracrinas que permiten la comunicación entre los ovocitos y las células somáticas circundantes, que ocurren de manera natural dentro del folículo ovulatorio²², afectando el porcentaje de fecundación *in vitro* y su desarrollo embrionario. El medio de cultivo comercial comúnmente utilizado para la IVM, es el TCM-199 suplementado con suero de origen animal o algún derivado de éste, es complejo y químicamente no definido, se han obtenido resultados aceptables; sin embargo, el uso de este medio presenta inconvenientes ya que contiene la hipoxantina, glucosa y fosfatos que han sido asociados con el bloqueo o inhibición del desarrollo embrionario temprano en bovinos y en hámsteres, gestación prolongada y mayor peso al nacimiento en ovinos, esto ha sido atribuido al uso de sueros o derivados en los medios de IVM, FIV, DIV²⁷. Como alternativa, se han desarrollado medios de cultivo simples químicamente definidos y libres de proteínas como el SOF. Los factores relacionados con el macho son principalmente la calidad de los espermatozoides, concentración, motilidad y morfología de los espermatozoides son fundamentales para la fecundación².

3.2.6 Complejo cúmulo-ovocitos

Los complejos cumulus ovocitos de alpaca son de color oscuro y se puede hacer la diferenciación a través de la pared del folículo por el método de transiluminación. El COC se ubica en el hemisferio del folículo que contiene el punto de ovulación esperado. Los ovocitos que se recolectan de folículos tienen un diámetro de 2 a 11 mm y oscilan de 172 y 200 micrómetros, cuando los ovocitos son inmaduros tienen una vesícula germinal muy diferente y es grande con un nucléolo oscuro, en cambio



los ovocitos maduros tienen una placa de metafase rodeada por un área oscura fácilmente observable con poco aumento²⁸.

3.2.7 Categoría del ovocito

La categoría se determina por una clasificación planteada por Wood⁶ y utilizado en diferentes investigaciones donde:

- Ovocito categoría I (Excelentes) presenta citoplasma oscuro uniforme combinado con 5 o más capas compactas de cumulus.
- Ovocito categoría II (Buenos) presenta citoplasma oscuro uniforme conjuntamente con una corona radiada completa pero menos de 5 capas de cumulus.
- Ovocito categoría III (Regulares) presentan una pérdida de la uniformidad del citoplasma, la corona radiada se presenta incompleta y las capas del cumulus presentes son menos compactas.
- Ovocito categoría IV (Malos) presentan citoplasma no homogéneo o francamente fragmentado y las células de la corona y del cumulus se encuentran disgregadas o ausentes en su totalidad.

Uno de los aspectos más importantes que se considera en la evaluación de la categoría de los ovocitos es cuando hay presencia de complejo ovocito cumulus, con mínimo 5 capas que cubran la totalidad de la superficie del ovocito, que el citoplasma sea de color gris oscuro y que sea uniforme y que no contenga manchas³.

Clasificación de COCs de Alpacas.

- Categoría I: COCs con cúmulos de capas múltiples (>5 capas), compacto citoplasma homogéneo.
- Categoría II: COCs parcialmente rodeados por células del cumulo (entre 2-4 capas), y con citoplasma homogéneo.
- Categoría III: COCs con cúmulo < o = 1 capa de granulosa o en partes desnudos y citoplasma variado.
- Categoría IV: Incluye a los ovocitos desnudos y con citoplasma granular.

3.2.8 Técnicas de recuperación de los COC.

Aspiración folicular: Se realiza una punción de la pared de los folículos antrales de entre 2 a 6 mm y la aspiración del líquido folicular se realiza utilizando agua unida a una jeringa o a una bomba de vacío. Aunque, la categoría de los ovocitos obtenidos resulte menor que la de los recuperados por disección folicular, ya que la aspiración ocasiona la separación de las células del cúmulo que están firmemente unidas a las

de la granulosa. La presencia de estas células tiene una importancia decisiva para la maduración y la fecundación *in vitro*.

Técnica Slicing: Esta técnica se realiza sujetando los ovarios con una pinza simple y se hacen cortes longitudinales sucesivos en la superficie ovárica utilizando un bisturí, recuperando los COCs del medio donde se encuentran sumergidos. El contenido se deja reposar por 10 minutos en una placa Petri, posteriormente se buscan los ovocitos en un estereoscopio, seleccionándolos y clasificándolos. Con la técnica slicing se puede recuperar gran cantidad de COCs por cada ovario, pero la población ovocitaria resulta muy heterogénea y es por este motivo que debe realizarse una estricta selección de los COCs ³.

3.2.9 Obtención de ovocitos

Se puede obtener ovocitos inmaduros de animales *in vivo* mediante técnicas de laparoscopia, laparotomía, aspiración folicular guiada por ultrasonido (OPU). También se puede obtener ovocitos inmaduros de animales beneficiados como es la obtención de los COCs de ovarios obtenidos *post mortem* esta técnica es la más económica para obtener ovocitos de forma numerosa y viable. Esta técnica conlleva factores externos que influyen en la manipulación de los COCs antes de realizar el cultivo, por lo tanto, pueden afectar en la expresión de la competencia del desarrollo¹. La colección de los ovarios, debe realizarse inmediatamente después del sacrificio del animal o dentro de los 30 minutos siguientes al sacrificio. El transporte se realiza con solución fisiológica o PBS con antibióticos. El tiempo que transcurre desde la colecta de muestras de ovarios hasta el cultivo de los ovocitos, debe oscilar entre 2 y 5 horas, aunque después de ocho horas desde la colecta de los ovarios todavía se puede conseguir la maduración *in vitro*, siempre y cuando los ovarios se mantengan por encima de 24 °C ³.

3.2.10 Tiempo y temperatura de transporte de ovarios

Para lograr un protocolo exitoso de fecundación *in vitro* es necesario controlar el tiempo de transporte, así como también la temperatura de almacenamiento de las muestras de ovarios, sin afectar la categoría y competencia de ovocitos y su desarrollo para poder asegurar la viabilidad y la capacidad que tendrá en la IVM y el posterior desarrollo embrionario. El manejo del tiempo y la temperatura son indispensables ya que un inadecuado manejo puede contribuir a efectos perjudiciales



en la categoría del ovocito, en términos de maduración nuclear y en porcentaje de división posterior a la FIV⁷.

Los factores externos como la manipulación de ovarios a diferentes temperaturas de almacenamiento y el tiempo de transporte según algunos estudios determinan que la categoría del complejo cúmulo ovocito está implicado directamente sobre el potencial de la maduración de los ovocitos, estos pueden permanecer en solución salina a temperatura de 30 a 37 °C durante 8 horas sin afectar su categoría o los procesos de IVM y FIV⁹.

3.2.11 Maduración *in vitro*

El proceso de maduración de los ovocitos permite una reducción en la carga cromosómica de la especie a la mitad, convirtiéndose en una célula haploide. En el proceso de maduración de ovocitos tanto *in vivo* como *in vitro*, hay una serie de cambios que permiten reiniciar la meiosis. Estos son eventos que tienen que ocurrir antes de la fecundación y se diferencian por la expansión de las células del cumulus, la eliminación del primer corpúsculo polar y la formación de la metafase II. Para la maduración *in vitro* de ovocitos, se pueden utilizar medios de cultivo clasificados en simples y complejos. El medio simple está producido por solución salina fisiológica bufferada usualmente con bicarbonato y adicionada de piruvato, lactato y glucosa. El medio de maduración complejo tiene además de los constituyentes de un medio simple, aminoácidos, vitaminas, purinas y otras sustancias asociadas al suero. En los camélidos sudamericanos se ha usado con mucho éxito el Tissue Culture Medium 199 (TCM 199) como estabilizadores de pH, suplementado con piruvato lactato, vitaminas, aminoácidos, proteína, y suero fetal bovino ³.

Algunos de los factores que pueden limitar la eficacia de la producción de embriones *in vitro*, depende de la maduración *in vitro* debido a que después de la selección homogénea de complejos cumulo-ovocito, solo la tercera parte o un poco más puede alcanzar la maduración citoplasmática completa y tienen la posibilidad de producir blastocitos viables para que puedan ser transferidos, lo que repercute en que esta técnica de reproducción asistida sea poco eficiente haciendo comparación con la producción de embriones *in vivo* ²⁵.

3.2.12 Maduración del núcleo del ovocito

Este es un proceso en el que le permite reducir la carga cromosómica de la especie a la mitad convirtiéndose así en una célula haploide. En un inicio de la maduración, el



núcleo del ovocito primario se encuentra bloqueado en la profase de diploteno de la primera división meiótica, estadio de vesícula germinal (GV). Cuando madura el folículo y en respuesta a la elevación preovulatoria de la LH, el ovocito vuelve a iniciar la división meiótica lo que ocasiona que el núcleo del ovocito entre en diacinesis, y terminando la profase I se disgrega la envoltura nuclear y se rompe la vesícula germinal. A su vez se produce una polimerización de los microtúbulos, desaparecen los nucléolos y los cromosomas se condensan y se orientan formando el huso acromático correspondiente a la metafase I. Después de esto se separan los cromosomas homólogos, se produce la extrusión del primer corpúsculo polar, y se origina el ovocito secundario con un solo par de cromosomas ⁶.

3.2.13 Fecundación *in vitro*

La fecundación *in vitro* es una alternativa de tecnología y es posible de ser aplicada en los programas de mejoramiento genético, para poder lograr el éxito de esta tecnología es indispensable controlar el tiempo de transporte, así como también la temperatura de almacenamiento de la muestra de ovarios sin afectar la categoría de los ovocitos y su desarrollo para asegurar la viabilidad y capacidad de la maduración *in vitro* y el posterior desarrollo embrionario. El tiempo y la temperatura representan dos factores muy importantes que contribuyen directamente en los efectos positivos o perjudiciales en cuanto a la categoría de ovocito, en términos de la maduración nuclear y porcentaje de división después de la FIV ⁷.

Posterior a la FIV se realiza necesariamente el cultivo *in vitro* en el cual se pueden desarrollar distintas técnicas haciendo uso de medio fluido de oviducto sintético (SOFm) y a este suplementarle con glutamina, aminoácidos esenciales y no esenciales, BSA ⁴.

3.2.14 Medio de maduración *in vitro* IVM

El medio IVM se utiliza para la maduración *in vitro* de ovocitos en el laboratorio la presentación es de 20 ml de medio IVM en frasco de vidrio, el medio está tamponado con bicarbonato de sodio y requiere CO₂ de equilibrio, viene listo para usar y no necesita ningún suplemento pero debe ser precalentado a 38.8 °C. Los ingredientes son Leptina, FSH y LH, factor de crecimiento epidérmico (EGF), midkina (MK), L-carnitina, piruvato de sodio, albúmina, sales inorgánicas, aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, bicarbonato de sodio, L-glutamina, glucosa, rojo fenol y gentamicina³⁸.



3.2.15 Medio de fecundación *in vitro* FIV

El medio FIV es utilizado para la fecundación *in vitro* de ovocitos maduros, viene en presentación de 20 ml en frasco de vidrio, es adecuado para el cultivo en placas 4WP con 500 µl/pocillo o en gotas de 100 µl. Para utilizarlo correctamente se debe utilizar una capa de aceite Stroebech para evitar la evaporación. El medio está tamponado con bicarbonato de sodio y requiere CO₂ de equilibrio, viene listo para usar y no necesita ningún suplemento pero debe ser precalentado a 38.8 °C. Los ingredientes son aminoácidos esenciales y no esenciales, PHE (penicilamina, hipotaurina, epinefrina), heparina, albúmina, piruvato de sodio, sales inorgánicas, aminoácidos esenciales y no esenciales, Ca-L-lactato, bicarbonato de sodio, ALA-glutamina, glucosa, rojo fenol y gentamicina³⁸.

3.2.16 Transferencia de embriones

No se logra establecer un protocolo adecuado para que la transferencia de embriones sea un éxito ya que existen complejos problemas como es la súper estimulación ovárica, la recolección de ovocitos y las condiciones de cultivo *in vitro*, ya que las muestras iniciales que se utilizan son ovarios colectados de mataderos y no se tiene información de un protocolo adecuado para la misma colección de los ovocitos ¹⁰.

3.3 Marco conceptual

- a) **Temperatura de transporte.** La temperatura está definida como una magnitud física que se expresa en grados Celsius de frío o calor de los cuerpos o del ambiente. El posible efecto de la temperatura de transporte de muestras de ovarios pueden repercutir en la categoría de los ovocitos ^{7, 39}.
- b) **Medio de transporte.** El medio, es la solución cloruro de sodio al 0.9 % utilizada como medio de transporte de muestras de ovarios colectadas *post mortem* de alpacas beneficiadas en matadero para comparar los resultados del efecto con y sin medio de transporte en la fecundación *in vitro*².
- c) **Tiempo de transporte.** El tiempo que transcurre desde la toma de muestra hasta que los ovarios llegan al laboratorio, el tiempo que es almacenada la muestra de ovario tiene

efecto sobre la categoría del ovocito esto tiene relación directa con la temperatura a la que es transportada la muestra de ovario ⁷.

- d) **Maduración *in vitro*.** La IVM de ovocitos es la técnica de obtener ovocitos inmaduros de folículos ováricos antrales sin estimulación, o mínimamente estimulados con gonadotropinas, para luego ser madurados bajo condiciones de laboratorio en medios de cultivo suplementados. Esta técnica permite obtener ovocitos en metafase II, para poder ser fecundados⁴⁰.
- e) **Fecundación *in vitro*.** De origen latín *fecundare* que significa “hacer fértil” referido a la capacidad de producir o generar nueva vida, biológicamente se centra en el proceso de unión de los gametos ovulo y espermatozoide para generar un nuevo organismo. Es un tipo de tecnología de reproducción asistida. Tiene 5 etapas como son la estimulación o superovulación para obtener ovocitos viables, retiro del ovulo, inseminación y fecundación². Para esta investigación el segundo corpúsculo polar será el indicativo positivo de fecundación *in vitro*.
- f) **Fertilización *in vitro*.** Un término que está relacionado con la fecundación *in vitro* es la fertilización *in vitro*, que proviene del latín *fertilis* que significa “fértil o productivo”, el cual se relaciona con la capacidad de la tierra para producir cultivos, y biológicamente se asocia más a la preparación de un medio para que ocurra la fecundación; sin embargo ambos términos son sinónimos, ya que se emplean para describir el mismo procedimiento³⁹.

CAPÍTULO IV

METODOLOGÍA

4.1 Tipo y nivel de investigación

El tipo de investigación es experimental ya que se realiza la manipulación de variables como son la temperatura y el medio de transporte para determinar el efecto que estas tienen sobre la fecundación *in vitro*. También se clasifica como un estudio prospectivo de corte transversal ya que se realiza en un momento dado sin seguimiento posterior.

El nivel es aplicativo por que se plantea una solución para el método de transporte de ovarios y obtener mejores resultados en la maduración y fecundación *in vitro*.

4.2 Diseño de la investigación

Previo beneficio de las alpacas en el matadero, siguiendo el protocolo para este propósito, se extrajeron 60 ovarios de 30 alpacas, que fueron transportados al laboratorio donde mediante la técnica de aspiración folicular se obtuvieron ovocitos, los cuales fueron clasificados y seleccionados las categorías I y II. En el primer objetivo se maduraron ovocitos que habían sido transportados a 5 y 15 °C en dos diferentes medios de transporte (con y sin cloruro de sodio al 0.9 %). En el segundo objetivo, se fecundaron ovocitos obtenidos de ovarios, que habían sido transportados en 5 y 15 °C, en dos diferentes medios de transporte (con y sin cloruro de sodio al 0.9 %). En ambos casos, se utilizaron 15 repeticiones.

4.3 Población y muestra

La población está representada por los ovarios de alpacas que fueron recolectados para esta investigación. Todos los animales estaban en edad reproductiva y aparentemente sanos.

La muestra en este estudio corresponde a los 60 ovarios de alpacas, recolectados y divididos en grupos según las condiciones de temperatura (5 y 15 °C) y medio de transporte (con y sin cloruro de sodio). Este muestreo fue no probabilístico debido a la disponibilidad de alpacas en el momento de la recolección de muestras en el matadero.

4.4 Procedimiento

a) Colección de muestras

- Los ovarios fueron recolectados en el matadero municipal de Ayaviri, previa coordinación con la administradora para asegurar la cantidad necesaria de alpacas que se necesitan, estas fueron beneficiadas el mismo día de la toma de muestra. Se empleó equipo de protección personal.
- Las muestras se recolectaron en el menor tiempo posible, desde el beneficio del animal hasta la recolección de la muestra transcurrió aproximadamente 20 minutos, extrayendo ambos ovarios y colocándolos en bolsas de plástico. Las muestras se dividieron en dos recipientes limpios, uno a 5 °C y otro a 15 °C, con y sin el medio de transporte.
- Para mantener las muestras dentro de los parámetros de temperatura, se utilizó cadena de frío con geles refrigerantes y termómetro digital, asegurando que un recipiente se mantuviera a 5 °C y el otro a 15 °C. Desde el beneficio de las alpacas hasta el momento en el que se trasladan al laboratorio y retiran los ovarios de los contenedores transcurrieron 12 horas, se inició con el trabajo en el laboratorio y se terminó con todas las muestras cuando se dejaron madurando en la incubadora de CO₂ esto en un lapso adicional de 4 horas.
- Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Biotecnología Reproductiva y Celular de la Universidad Científica del Sur.

b) Operaciones realizadas en laboratorio

- En el laboratorio, los ovarios se lavaron con suero fisiológico a temperatura ambiente y se secaron con papel toalla. Se removió el tejido adyacente, el cuerpo lúteo y restos de sangre con suero fisiológico al 0.9 % a 35 °C. Posteriormente, los ovarios se colocaron en placas Petri que contenían solución cloruro de sodio.
- La técnica que se empleó para la extracción de ovocitos fue de aspiración. El líquido acumulado en las placas Petri se depositó en otras placas y se dejó reposar durante 10 minutos.
- En la cabina de flujo laminar con una micropipeta (vitrolife), se recuperó el líquido de la superficie, y posteriormente se observó bajo un estereoscopio para realizar el conteo y la clasificación de los ovocitos según su categoría en placas de 5 pocillos. Solo se utilizaron los ovocitos de categoría I y II.



- Para la maduración de los ovocitos, se utilizó medio de cultivo IVM Medium de Stroebech, que requiere equilibrio con CO₂ y se precalentó a 38.8 °C antes de su uso y se dejó madurar a los ovocitos durante 36 horas.
- El medio utilizado para la fecundación *in vitro* fue FIV Medium de Stroebech, adecuado para cultivos en placas de 4 pocillos (4WP) con 500 µl por pocillo, o en gotas de 100 µl. Se agregó una capa de aceite Stroebech Oil para evitar la evaporación, equilibrando el medio con CO₂ y precalentándolo a 38.8 °C antes de usar.
- La muestra se incubó durante un máximo de 24 horas a 38 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂. La fecundación *in vitro* se consideró exitosa entre las 16 y 22 horas de incubación, tras la observación del segundo corpúsculo polar.

4.5 Técnica e instrumentos

Las técnicas e instrumentos utilizados básicamente se enfocaron en la recolección, transporte, maduración y fecundación de los ovocitos de alpaca. A continuación, se detallan:

Técnicas

- Recolección de muestras: Los ovarios fueron recolectados de alpacas sacrificadas en el matadero, mediante extracción de los ovarios.
- Transporte: Los ovarios fueron transportados a dos temperaturas diferentes 5 y 15°C, en condiciones de presencia y ausencia de medio de transporte.
- Extracción de ovocitos: Se utilizó la técnica de aspiración folicular.
- Maduración de ovocitos: Los ovocitos se incubaron en un medio de cultivo específico (IVM Medium de Stroebech) a 38.8 °C en atmósfera controlada de CO₂ durante 36 horas.
- Fecundación *in vitro* (FIV): Los ovocitos se incubaron en FIV Medium de Stroebech, en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂. La presencia del segundo corpúsculo polar fue el indicador positivo de fecundación.

Instrumentos

- Equipo de protección personal: botas, casco, guantes de látex y bisturí.
- Geles refrigerantes y termómetro digital para mantener y monitorear las temperaturas de transporte de los ovarios.



- Placas Petri, utilizadas para colocar los ovarios y realizar los cortes en la técnica de aspiración folicular.
- Micropipeta para recolectar el líquido y recuperar los ovocitos en las placas Petri.
- Medios de cultivo (IVM y FIV Medium de Stroebech): medios específicos para la maduración y la fecundación de los ovocitos.
- Incubadora de CO₂ para controlar la temperatura y la atmósfera durante la maduración y fecundación de los ovocitos.
- Estereoscopio para observar y contar los ovocitos recuperados y fecundados.
- Microscopio invertido (marca Evos) para visualizar la maduración y la fecundación de los ovocitos.

4.6 Análisis estadístico

En el modelo aditivo lineal adyacente a la prueba de Kruskal-Wallis se ha empleado dos factores en el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \text{Temp} + \text{MedTransp} + \text{Temp} \times \text{MedTransp} + e_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Porcentaje de maduración y porcentaje de fecundación

μ = Media general

Temp = Temperatura (5 y 15°C)

MedTransp = Medio de Transporte (con y sin solución salina al 0.9 %)

e_{ij} = Error aleatorio

Previamente se realizó, la transformación de datos que se encontraban en porcentajes a valores arcoseno. Se realizó la evaluación de supuestos de normalidad, homogeneidad varianzas e independencia de residuos, mediante el test de Anderson-Darling, el test de Levene y el test de Durbin-Watson, respectivamente. En vista que los datos no cumplían con el supuesto de la normalidad, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Asimismo, se empleó la prueba de Dunn para comparar las medianas.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Análisis de resultados

5.1.1 Temperatura y medio de transporte sobre la maduración de ovocitos de alpacas (*Vicugna pacos*)

La tabla 2, muestra el efecto de la temperatura y el medio de transporte sobre el porcentaje de maduración de ovocitos, donde el transporte de ovarios a diferentes temperaturas tales como 5 y 15 °C no afectaron el porcentaje de maduración de ovocitos (p-valor = 0.9408). Asimismo, se observa que el medio de transporte, en sus niveles con y sin medio, no repercuten en el porcentaje de maduración de ovocitos (p-valor = 0.7553). En ambos casos, tanto la temperatura como el medio de transporte no mostraron efectos significativos sobre el porcentaje de maduración de ovocitos seleccionados de las categorías I y II.

Tabla 2 Efecto de la temperatura y el medio de transporte sobre el porcentaje de la maduración de ovocitos.

Variables	Niveles	N	Media $\pm$ DS	Mediana	P-valor	Sig.
Temperatura	5 °C	29	22.11 $\pm$ 10.14	23.33	0.9408	a
	15 °C	30	20.83 $\pm$ 14.85	20.20		a
Medio de transporte	Sin	29	21.98 $\pm$ 14.42	23.08	0.7553	a
	Con	30	20.95 $\pm$ 10.92	22.38		a

5.1.2 Temperatura y medio de transporte sobre el porcentaje de fecundación de ovocitos de alpacas (*Vicugna pacos*).

En la tabla 3, se muestran el porcentaje de fecundación de ovocitos, los cuales fueron transportados al laboratorio bajo diferentes condiciones de temperatura y medios de transporte. Las temperaturas utilizadas (5 y 15 °C) no afectaron al porcentaje de fecundación *in vitro* de ovocitos (p-valor = 0.1174) seleccionados de categorías I y II. Sin embargo, cuando los ovocitos contenidos en los ovarios fueron transportados en medio solución salina al 0.9 %, y seleccionados en categorías I y II, tuvieron mayor respuesta a la fecundación que aquellos que fueron transportados sin medio de transporte (p-valor = 0.04991).



Tabla 3. Efecto de la temperatura y el medio de transporte sobre el porcentaje de fecundación de ovocitos

Variable	Niveles	N	Media $\pm$ DS	Mediana	P-valor	Sig.
Temperatura	5°C	29	15.52 $\pm$ 7.53	15	0.1174	a
	15°C	30	12.08 $\pm$ 7.46	13.39		a
Medio de transporte	Sin	29	11.44 $\pm$ 8.45	11.11	0.0499	a
	Con	30	16.02 $\pm$ 6.06	14.29		b

5.2 Discusión

Acerca de la temperatura sobre la maduración de ovocitos de alpacas, se ha reportado que los ovocitos contenidos en los ovarios transportados a temperatura de 5 y 15 °C en solución salina 0.9 % como medio de transporte y madurados *in vitro*, dan como resultado similares porcentajes de maduración. Evecen²², sugiere que es probable que el transporte a 4 °C permita que el metabolismo sea más lento y de esta manera se disminuya el daño oxidativo y el estrés metabólico evitando la apoptosis del COC. Por otro lado, Yang⁴¹ indica que temperaturas inferiores a 5 °C podrían ocasionar daño estructural en las membranas celulares ya que existe la posibilidad de formación de cristales de hielo intracelulares, estrés osmótico y posteriormente tener efecto negativo en la maduración y fecundación *in vitro*. Según Arriaga⁸, el transporte de ovarios entre 22 a 25 °C mantiene la calidad morfológica de los ovocitos, y se obtiene mayor porcentaje de maduración *in vitro*. En otro estudio, Huanca⁴² sugiere que para obtener mejor calidad morfológica en ovocitos estos deben ser transportados en suero fisiológico a 35 °C, ya que no se obtuvo el mismo resultado con los que fueron transportados a 4 °C, contrario al resultado de la presente investigación, donde se trabajó con 5 °C y se obtuvieron resultados similares al de temperaturas más altas. Castro⁵, después de utilizar una temperatura intermedia a nuestro trabajo, en el transporte de ovarios, informa que se mantiene la calidad de los ovarios a 10 °C para ser madurados y fecundados *in vitro* posteriormente. La variedad de temperaturas utilizadas en diferentes investigaciones para lograr mantener la viabilidad del ovocito sugiere que la temperatura no sería un factor predisponente para obtener resultados positivos de maduración y fecundación *in vitro*, así como se demostró en esta investigación.

El efecto del medio de transporte sobre la maduración del ovocito ha demostrado tener diversos resultados, en la investigación de Ratto³⁰, los ovarios se transportaron en un termo que contenía solución salina tamponada con fosfato, los ovocitos se obtuvieron mediante



aspiración folicular y se utilizaron ovocitos de categoría I y II, los resultados fueron similares entre los tiempos 28, 30 o 36 horas de cultivo de la IVM. En la presente investigación, se utilizó 36 horas para evaluar la maduración del ovocito ya que así se tendrá mayor seguridad del porcentaje de ovocitos maduros. En el estudio de Castro⁵, los ovarios fueron transportados al laboratorio en solución salina al 0,9 % los ovocitos se obtuvieron por aspiración folicular, se seleccionaron los de categoría I y II, y estos se maduraron *in vitro* en medio TCM199 suplementado, durante 32-36 horas a 38,5 °C como protocolo estándar para después realizar ICSI y FIV, esto es similar al protocolo de transporte empleado en la presente investigación. Ruiz¹², utilizó un protocolo para medio de transporte con solución salina tamponada con fosfato suplementado con penicilina (100 UI/ml) y estreptomicina (100µg/ml,) concluyó que la maduración *in vitro* da como resultado porcentajes más altos de MII cuando se utiliza medios suplementados, a diferencia de esta investigación donde no fue necesario suplementar el medio de transporte, ya que el uso o ausencia de medio no repercutió en la IVM. Huanca⁴², utiliza como protocolo básico la solución salina como medio de transporte para luego realizar IVM, al igual que en esta investigación. Laines¹¹, para el transporte de ovarios utiliza solución salina fisiológica 0,9 % suplementada con gentamicina (80ug/ml), como en otras investigaciones el medio de transporte da similares resultados de IVM. Según Leisinger²⁴ un factor que podría afectar la maduración de los ovocitos es la edad de las alpacas así que realizó la comparación de alpacas adultas frente a jóvenes, pero no encontró diferencia significativa en sus resultados, por lo tanto, la edad no sería un factor que influya en la maduración de ovocitos en esta investigación ya que desconocemos la edad de las alpacas que se beneficiaron y de las cuales de recolectaron los ovarios.

Respecto a la temperatura sobre el porcentaje de fecundación de ovocitos de alpaca, el transporte de ovarios según Arriaga⁸ almacenados entre 22 a 25 °C obtiene mejor porcentaje de FIV a las 72 horas frente a los que se almacenaron entre 12 a 15 °C. Laines¹¹ comparó medios de cultivo utilizando una temperatura de 10.52 °C como protocolo estándar de temperatura de transporte. Esto sugiere que al igual que en la investigación desarrollada, la temperatura de transporte no influye significativamente en el porcentaje de la FIV. Vasquez¹⁵ evaluó dos métodos de colección de ovocitos sobre la cantidad y calidad ovocitaria para el transporte utilizó una sola temperatura de 35 °C, contrario a esta investigación, ya que empleamos temperaturas de 5 y 15 °C. Robledo²⁷, sugiere que la temperatura adecuada para el transporte es de 25-30 °C para lograr la producción de embriones o FIV, diferente a la temperatura utilizada en esta investigación, sin embargo,



corroborar que la temperatura no es un factor indispensable en el transporte y su efecto en la FIV.

El efecto del medio de transporte sobre el porcentaje de la fecundación de ovocitos de alpaca, indica que el transporte de ovarios con solución salina, mostró un mayor porcentaje de fecundación *in vitro* de ovocitos frente a los que fueron transportados sin solución salina. Lo que es congruente con el reporte de Yang⁴¹, quien afirma que el medio de transporte en los ovarios en soluciones enriquecidas contribuye a mantener la condición osmótica estable, evitando la lisis de las células por los cambios de la presión osmótica. Al respecto, Evecen²² coincide con que el uso de medios de transporte que tengan nutrientes y antioxidantes reduce el daño ocasionado por radicales libres y disminuye el estrés de las células de cumulus indispensables para la maduración y fecundación de ovocitos ya que son las que proporcionan señales paracrinas. Según las observaciones de Conde⁷, el uso de medios de transporte con soluciones específicas para ovocitos de llamas y alpacas puede mejorar la viabilidad y el desarrollo de los embriones después de la fecundación *in vitro*. Otros estudios, como el de Quispe⁴³, también destaca que los medios de transporte enriquecidos con cloruro de sodio, soluciones de PBS o MEM, ayudan a mantener la integridad del complejo cúmulo-ovocito durante el transporte en alpacas y otros camélidos sudamericanos, favoreciendo un mayor porcentaje de fecundación y desarrollo embrionario. Los resultados obtenidos en los estudios de Huanca⁴² muestran mejor categoría morfológica de ovocitos los que fueron transportados con medio suero fisiológico a 35 °C. Robledo²⁷ en su investigación concluye que el porcentaje de FIV tiene mejor respuesta cuando los ovocitos se transportaron en solución salina al 0.9 %. En otro estudio realizado por Gomes²⁵ muestra que los folículos se conservaron de mejor manera a 4 °C en solución salina tamponada con fosfato. Estos reportes coinciden con los resultados obtenidos en esta investigación ya que al margen de la temperatura cuando se transporta a los ovarios con medio se obtienen mejores resultados en la fecundación *in vitro* de ovocitos.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

Se logran porcentajes similares de maduración de ovocitos *in vitro* a 38.8 °C, cuando se utilizan ovocitos de categoría I y II aspirado de ovarios transportados a temperaturas de 5 a 15 °C. Asimismo, el empleo de solución salina como medio de transporte no afecta la maduración de los ovocitos.

La utilización de solución salina al 0.9 % como medio de transporte de ovarios incrementa el porcentaje de fecundación de ovocitos, lo cual aporta a los protocolos de transporte de ovarios para mejorar la fecundación *in vitro* de ovocitos de alpaca. La temperatura a la que se transportan los ovarios 5 y 15 °C no influye en la fecundación *in vitro*.

6.2 Recomendaciones

Es posible utilizar temperaturas de 5 y 15 °C en el transporte de ovarios de alpaca, los cuales no afectan el porcentaje de maduración y fecundación *in vitro*. La elección puede ajustarse a la disponibilidad de recursos o condiciones ambientales.

Utilizar solución salina como medio de transporte para mejorar el porcentaje de fecundación *in vitro* en ovocitos de alpaca, ya que se preserva la viabilidad celular durante el transporte. Se podría ampliar las investigaciones referentes al uso de diferentes medios de transporte con otros componentes, como soluciones enriquecidas o medios suplementados con nutrientes, para conocer si se puede incrementar aún más el porcentaje de maduración y fecundación de los ovocitos.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gonzales Figueroa H, Gonzales Molfino HM. Biotecnología reproductiva: una alternativa para mejorar la producción animal. Biotempo. 2005; 5: p. 5-11.
2. Aba MA. Anatomy and Physiology of Reproduction in the Female Llama and Alpaca; 2014.
3. Chupin D, Thibier M. Survey of the present status of the use of artificial insemination in developed countries. World animal review. 1995; 82.
4. Health Illustrated Encyclopedia. Medline Plus. [Online]; 2024. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/007279.htm>.
5. Castro Modesto T, Mamani P, Pella R, Bravo Z, Villarreal S, Gancho C, et al. Effect of follicle size on in vitro maturation in alpaca oocytes (Vicugna pacos) and the first ICSI in alpaca species. Small Ruminant Research. 2022; 213(106680). <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2022.106680>
6. Gandarillas D. Manual Técnico: Producción de Embriones in vitro de Alpacas. Primera ed. Grohmann UNJB, editor. Tacna: Biblioteca Nacional del Perú; 2021.
7. Conde PA, Herrera , Trasorras Virginia L. , Giuliano SM, Director A, Miragaya MH, et al. In vitro production of llama (Lama glama) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. Animal Reproduction Science. 2008; 109: p. 298-308. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.10.004
8. Arriaga I, Huanca W, Terreros M, Garcia P, Ampuero A, Becerra JJ. Efectos de temperatura y tiempo de almacenamiento de ovarios de alpacas sobre la tasa de maduración y división in vitro de ovocitos. Rev Inv Vet Perú. 2014; 25: p. 477-486. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10783>
9. Gomez Oscar E. , Choque D, Henao F, Escobedo MH, Valverde N. Comparison of three recovery methods of alpaca cumulus-oocyte complexes (COCs) harvested from postmortem ovaries. Spermova. 2013; 3(1): p. 103-104.
10. Landeo L, Zuñiga M, Gastelu T, Artica M, Ruiz J, Silva M, et al. Oocyte Quality, In Vitro Fertilization and Embryo Development of Alpaca Oocytes Collected by Ultrasound-Guided Follicular Aspiration or from Slaughterhouse Ovaries. animals. 2022; 12: p. 1102. <https://doi.org/10.3390/ani12091102>



- .11. Laines Arcce M, Contreras M, Olaguivel C. Evaluación de dos medios de cultivo en la producción de embriones in vitro de alpacas (*Vicugna pacos*). *Spermova*. 2021; 11(1): p. 46-52. DOI. 10.18548/aspe/0009.07
12. Ruíz J, Santayana P, Mendoza J, Landeo LJ, Huaman E, Ticllacuri F, et al. Effect of oocyte maturation time, sperm selection method and oxygen tension on in vitro embryo development in alpacas. *Theriogenology*. 2017; 95: p. 127-132. DOI:10.1016/j.theriogenology.2017.03.006
13. García W, Alarcón V, Bravo W. Inseminación Artificial de Alpacas con Semen Refrigerado y con Inclusión de Dos Tipos de Yema de Huevo. *Rev Inv Vet Perú*. 2017; 28: p. 337-344. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i2.13080>.
14. Durand Pérez MG, Zevallos JP, Perez UH. Comparación de sistemas de cultivo de embriones de alpacas. *Rev. Investig. Altoandin*. 2017; 19(2): p. 157-164. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2017.274>
15. Vasquez NF, Perez MG, Olivera LV, Perez UH. Efecto de dos métodos de colección sobre la cantidad y calidad ovocitaria de Alpacas (*Vicugna pacos*) y Llamas (*Lama glama*) post mortem. *Revista de investigacion altoandina*. 2015; 17(3): p. 331-340. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2015.144>.
16. Ruiz J, Landeo L, Mendoza J, Carrea J, Silva M, Ratto M. Competencia de desarrollo in vitro de ovocitos de alpaca (*Vicugna pacos*) y llama (*Lama glama*) después de la activación partenogénica. *Investigación de pequeños rumiantes*. 2015; 133: p. 148-152.
17. Huanca W, Condori R, Chileno M, Garcia PH, Cainzo J, Becerra JJ. Evaluación de cuatro tiempos de cultivo sobre la tasa de maduración y división posfecundación in vitro de ovocitos de alpaca. *Rev Inv Vet*. 2014; 25: p. 468-476. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10782>
18. Gómez Quispe OE, Alva Villavicencio G, Huillcas FV, Salinas D. Tecnicas del slicing y aspiracion folicular en la eficiencia de la recuperacion de ovocitos bovinos criollos post mortem en el camal. *Spermova*. 2012; 2(1): p. 38-39.
19. Morante R, Goyache F, Burgos A, Cervantes I, Perez MA, Gutierrez JP. Genetic improvement for alpaca fibre production in the Peruvian Altiplano: the Pacamarca experience. *Animal Genetic Resources Information*. 2009; 45: p. 37-43. doi:10.1017/S1014233909990307
20. Ramos Maguiña ES. Maduración y fertilización in vitro de ovocitos de *Vicugna pacos* alpaca. Repositorio UNMSM. 2009.



21. Huanca W, Palomino JM, Cervantes M, Cordero A, Huanca T. Efecto de temperaturas de transporte (35°C, 4°C) sobre la calidad morfológica de ovocitos colectados desde ovarios de alpaca. Sitio Argentino de Producción Animal. 2007.
22. Evecen M, Ramazan A, Kamber D, Selin Y, Nur E, Nihan C, et al. Effects of Ovary Transport and Storage Temperature on In Vitro Maturation and Cumulus Cell Apoptosis Rates in Cat Oocytes. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*. 2018; 24(2): p. 301-306. DOI: 10.9775/kvfd.2017.18880
23. Lorenzo M, Tello MF, Fischman ML, Lombardo DM. Comparación de dos técnicas para la obtención de complejos cumulus ovocito porcinos. In *Vet*. 2015; 17: p. 25-34. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179144263003>
24. Leisinger C, Coffman EA, Coutinho MA, Forshey B, Pinto C. Factors affecting in vitro maturation of alpaca(Lama paco) oocytes. *Animal Reproduction Science*. 2014; 150: p. 70-75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.08.011>
25. Gomes RG, Andrade ER, Lisboa LA, Ciquini A, Barreiros TRR, Fonseca NAN, et al. Effect of holding medium, temperature and time on structural integrity of equine ovarian follicles during the non-breeding season. *Theriogenology*. 2012; 78: p. 731-736. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.019>
26. Kershaw CM, Maxwell WMC. The effect of seminal plasma on alpaca sperm function. *Theriogenology*. 2011; 76: p. 1197-1206. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.05.016
27. Robledo Verduzco JM. Evaluación de dos medios de maduración in vitro para la producción de embriones ovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 2009; 10: p. 95-99. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93911243009>
28. Ratto M, Gomez C, Bernald M, Adams GP. Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Animal Reproduction Science*. 2007; 97: p. 246-256. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.02.002.
29. Wani N, Nowshari MA. Kinetics of nuclear maturation and effect of holding ovaries at room temperature on in vitro maturation of camel (*Camelus dromedarius*) oocytes. *Theriogenology*. 2005; 64: p. 75-85. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.11.009
30. Ratto M, Berland M, Huanca W, Singh J, Adams GP. In vitro and in vivo maturation of llama oocytes. *Theriogenology*. 2005; 63: p. 2445-2457. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.09.053



31. Miragaya M, Chaves MG, Aguero A. Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Ruminant Research*. 2006; 61: p. 299-310. doi:10.1016/j.smallrumres.2005.07.017
32. Holt WV, Pickard AR. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Reviews of Reproduction*. 1999; 4: p. 143-150.
33. Trasorras V. In Vitro Production of Embryos in South American Camelids. *Animal Reproduction Science*. 2013; 136: p. 187-193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.009>
34. Rodríguez JS, Moresco A. Evaluación clínica de la función reproductiva de los camélidos del nuevo mundo. *Zoológica Neo Tropical*. 2019; 4(1).
35. Málaga Chuquitaype RE. Adaptación de un protocolo de fertilización in vitro para alpacas (*Vicugna pacos*) y su evaluación a 4200 msnm en el departamento de Puno. Repositorio de Tesis UCSM. 2015.
36. Hassan S, Ali JA. Estudiar los efectos del tamaño folicular en algunos procesos bioquímicos foliculares. Composición fluida en la camella (*Camelus dromedarius*). *Avances en Ciencias Veterinarias y Animales*. 2018; 6(8): p. 341-346. DOI | <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2018/6.8.341.3>
37. Mehri S, Levi Setti PE, Greco K, Sakkas DG. Correlación entre los diámetros foliculares y el lavado frente a la ausencia de lavado en la madurez de los ovocitos, la tasa de fertilización y la calidad embrionaria. *Revista de Reproducción Asistida y Genética*. 2014; 31(73-77). <https://doi.org/10.1007/s10815-013-0124-9>.
38. Media S. Stroebech Media Assisted Reproduction Techniques in Animal. [Online]. Disponible en: <https://www.stroebech-media.com/ivf-media-products/ruminant-media-products/ivm-medium/>.
39. Española RA. Diccionario de la lengua española. 23rd ed.; 2014.
40. Vargas Tominaga L, Pella Cáceres R, Vargas Lechuga A, Bartolo Durán L. Maduración in vitro de ovocitos: alternativa efectiva en reproducción asistida. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*. 2012; 58(4).
41. Yang Q. Analysis of maturation dynamics and developmental competence of in vitro matured oocytes under time-lapse monitoring. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2021; 19(183).



42. Huanca W, Palomino JM, Cervantes M, Cordero A, Huanca T. Efecto de temperaturas de transporte (35°C, 4°C) sobre la calidad morfológica de ovocitos colectados desde ovarios de alpacas. APPA-ALPA. 2007.
43. Quispe EC, Alfonso L, Flores A, Guillén H, Ramos Y. Bases para un programa de mejora de alpacas en la región altoandina de Huancavelica-Perú. Archivos de Zootecnia. 2009; 58(224): p. 705-716. DOI: 10.4321/S0004-05922009000400008
44. Jaramillo HAL. Histograma y distribución normal: Shapiro-Wilk y Kolmogorov Smirnov aplicado en SPSS. Revista Latinoamericana de Ciencias Sociales y Humanidades. 2023; IV(4): p. 596.
45. Strączyńska P. Signaling mechanisms and their regulation during in vivo or in vitro maturation of mammalian oocytes. Reproductive Biology and Endocrinology. 2022; 20(37).
46. Abdelfattah A, Agag M, Nasef M, Shanmugavelu M, Elraey M, Karen A. Preservation of dromedary camel embryos at 4°C for up to 5 days, factors affecting the pregnancy and pregnancy loss rates. Theriogenology. 2020; 143: p. 44-49. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.024>
47. Holt WV, Pickard AR. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. Reviews of Reproduction. 1999; 4: p. 143-150.



ANEXOS



ANEXO 1. TABLAS

ANÁLISIS DE VARIANZA Y COMPARACION DE MEDIAS PARA PORCENTAJE DE MADURACION DE OVOCITOS

Tabla 4. Análisis de varianza

Variable respuesta: Maduración

Variables	GL	GL Residual	F value	Pr(>F)
Medio de Transporte	1	56	0.00021223	0.98843
Temperatura	1	56	0.0685498	0.79442
Medio de transporte: Temperatura	1	56	0.24613372	0.62175

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tabla 5. Comparación de medianas

a. Maduración por medio de transporte

Kruskal-Wallis rank sum test

data: Maduración_arcoseno by MedioTransp

Kruskal-Wallis chi-squared = 0.097147, df = 1, p-value = 0.7553

data: x and group

kruskal-wallis chi-squared = 0.0971, df = 1, p-value = 0.76

Comparison of x by group
(Bonferroni)

```
Col Mean-|
Row Mean |          1
-----+-----
      2 |  0.311683
      |  0.3776
```

alpha = 0.05

Reject Ho if p <= alpha/2

b. Maduración por temperatura

Kruskal-Wallis rank sum test

data: Maduración_arcoseno by Temperatura

Kruskal-Wallis chi-squared = 0.0055072, df = 1, p-value = 0.9408

```
data: x and group
kruskal-wallis chi-squared = 0.0055, df = 1, p-value = 0.94
```

```

                                Comparison of x by group
                                (Bonferroni)

Col Mean-|
Row Mean |          1
-----+-----
      2 |    0.074210
      |    0.4704

alpha = 0.05
Reject Ho if p <= alpha/2

```

Tabla 6. Evaluación de normalidad: Anderson-Darling

```
ad.test(dDataFecunda$Maduraci_arcoseno)Anderson-Darling
normality test
```

```
data: dDataFecunda$Maduraci_arcoseno
```

```
A = 3.5623, p-value = 5.233e-09
```

Tabla 7. Análisis de varianza y comparación de medias para porcentaje de fecundación

Variable respuesta: Fecundación

Variables	GL		F value	Pr(>F)	Sig.
	GL	Residual			
Medio de transporte	1	55	4.92021	0.030692	*
Temperatura	1	55	3.07835	0.084911	.
Medio de transp:Temperatura	1	55	0.41413	0.522557	

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tabla 8. Comparación de medias

a. Fecundación por medio de transporte

```
Kruskal-Wallis rank sum test
```

```
data: Fecundac_arcoseno by MedioTransp
```

```
Kruskal-Wallis chi-squared = 3.8446, df = 1, p-value = 0.04991
```

```
data: x and group
kruskal-wallis chi-squared = 3.8446, df = 1, p-value = 0.05
```

```

                                Comparison of x by group
                                (Bonferroni)

Col Mean-|
Row Mean |                1
-----+-----
      2 |   -1.960769
      |       0.0250*
```

```
alpha = 0.05
Reject Ho if p <= alpha/2
```

b. Maduración por temperature

Kruskal-Wallis rank sum test

```
data: Fecundac_arcoseno by Temperat
```

```
Kruskal-Wallis chi-squared = 2.451, df = 1, p-value = 0.1174
```

```
data: x and group
kruskal-wallis chi-squared = 2.451, df = 1, p-value = 0.12
```

```

                                Comparison of x by group
                                (Bonferroni)

Col Mean-|
Row Mean |                1
-----+-----
      2 |   1.565575
      |       0.0587
```

```
alpha = 0.05
Reject Ho if p <= alpha/2
```

Tabla 9. Test de normalidad: Anderson-Darling

```
ad.test(dDataFecunda$Fecundac_arcoseno) Anderson-Darling normality test
```

```
data: dDataFecunda$Fecundac_arcoseno
```

```
A = 2.9344, p-value = 1.822e-07
```

Tabla 10. Datos de ovocitos transportados a 5 °C

5°C			
Medio	Inmaduro	Maduro	Fecundado
S	68.00%	8.00%	24.00%
S	60.00%	10.00%	30.00%
S	55.00%	35.00%	10.00%
S	37.50%	37.50%	25.00%
S	55.56%	33.33%	11.11%
S	62.50%	0.00%	37.50%
S	100.00%	0.00%	0.00%
S	65.00%	20.00%	15.00%
S	85.00%	5.00%	10.00%
S	100.00%	0.00%	0.00%
S	50.00%	40.00%	10.00%
S	50.00%	33.33%	16.67%
S	54.55%	27.27%	18.18%
S	61.54%	23.08%	15.38%
S	61.54%	30.77%	7.69%
C	58.82%	23.53%	17.65%
C	52.94%	23.53%	23.53%
C	60.00%	20.00%	20.00%
C	66.67%	20.00%	13.33%
C	70.00%	20.00%	10.00%
C	70.00%	20.00%	10.00%
C	56.67%	26.67%	16.67%
C	66.67%	23.33%	10.00%
C	57.14%	14.29%	28.57%
C	62.50%	25.00%	12.50%
C	53.33%	26.67%	20.00%
C	66.67%	20.00%	13.33%
C	46.67%	26.67%	26.67%
C	60.00%	26.67%	13.33%
C	57.14%	21.43%	21.43%

Tabla 11. Datos de ovocitos transportados a 15 °C

15°C			
Medio	Inmaduro	Maduro	Fecundado
S	50.00%	50.00%	0.00%
S	66.67%	16.67%	16.67%
S	53.85%	30.77%	15.38%
S	61.54%	30.77%	7.69%
S	60.00%	20.00%	20.00%
S	70.00%	20.00%	10.00%
S	62.50%	37.50%	0.00%
S	50.00%	37.50%	12.50%
S	70.00%	30.00%	0.00%
S	50.00%	30.00%	20.00%
S	66.67%	16.67%	16.67%
S	100.00%	0.00%	0.00%
S	100.00%	0.00%	0.00%
S	94.44%	0.00%	5.56%
S	71.43%	14.29%	14.29%
C	92.86%	0.00%	7.14%
C	71.43%	14.29%	14.29%
C	92.31%	0.00%	7.69%
C	58.33%	33.33%	8.33%
C	63.64%	27.27%	9.09%
C	50.00%	35.71%	14.29%
C	63.64%	18.18%	18.18%
C	81.82%	0.00%	18.18%
C	57.14%	28.57%	14.29%
C	42.86%	42.86%	14.29%
C	66.67%	11.11%	22.22%
C	52.94%	35.29%	11.76%
C	42.11%	31.58%	26.32%
C	62.50%	12.50%	25.00%
C	87.50%	0.00%	12.50%

ANEXO 2. FIGURAS

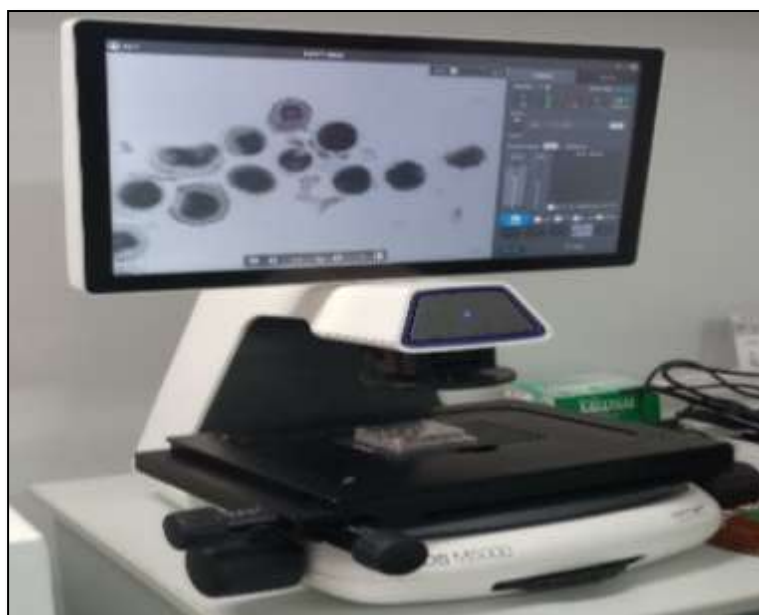


Figura 1. Microscopio invertido evos, clasificación de categoría de ovocitos.



Figura 2. Ovocitos de alpaca de diferentes categorías.

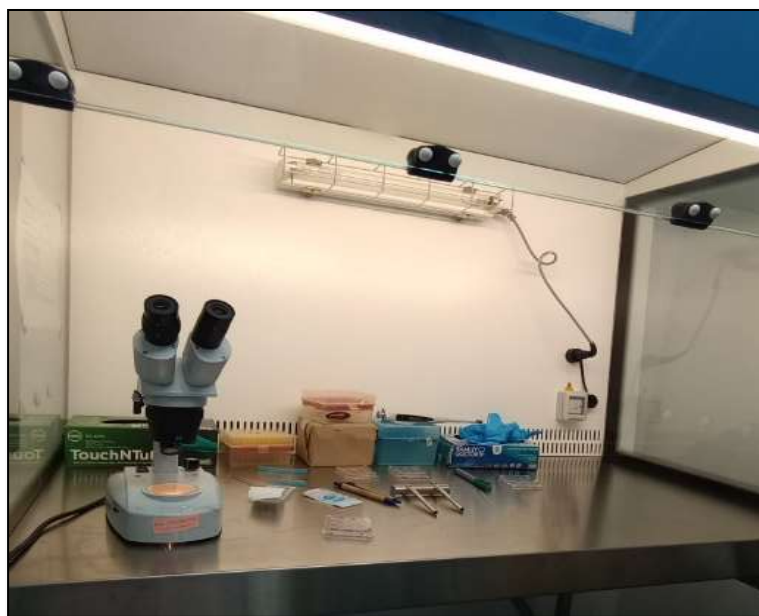


Figura 3. Cabina de flujo laminar para trabajar la maduración y fecundación de ovocitos.



Figura 4. Equipos de laboratorio utilizados para la investigación.



Figura 5. Ovocitos clasificados según categoría I y II.



Figura 6. Pocillos pre calentados con medio para maduración de ovocitos.



Figura 7. Ovulo fecundado, se observa la extrucción del primer y segundo cuerpo polar.



Figura 8. Embrión de alpaca de 4 células.

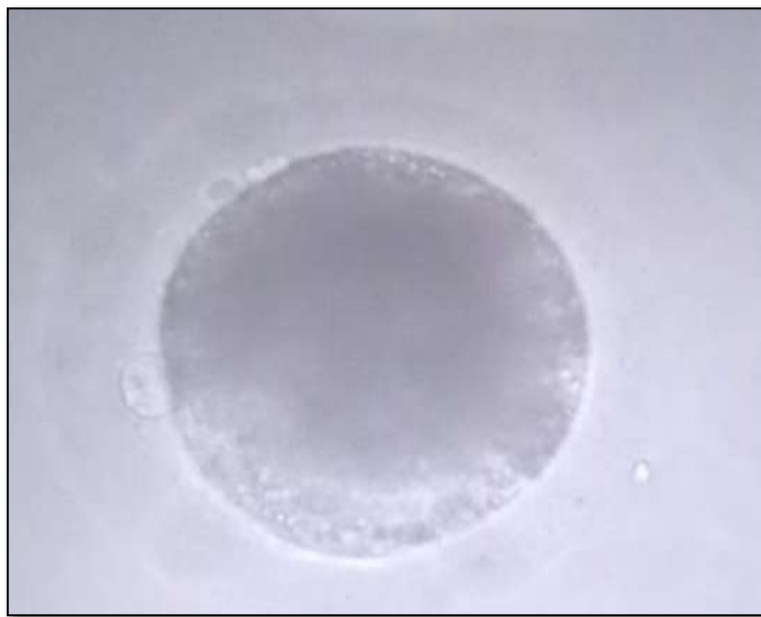


Figura 9. Ovocito maduro, se observa la extrucción del primer cuerpo polar.

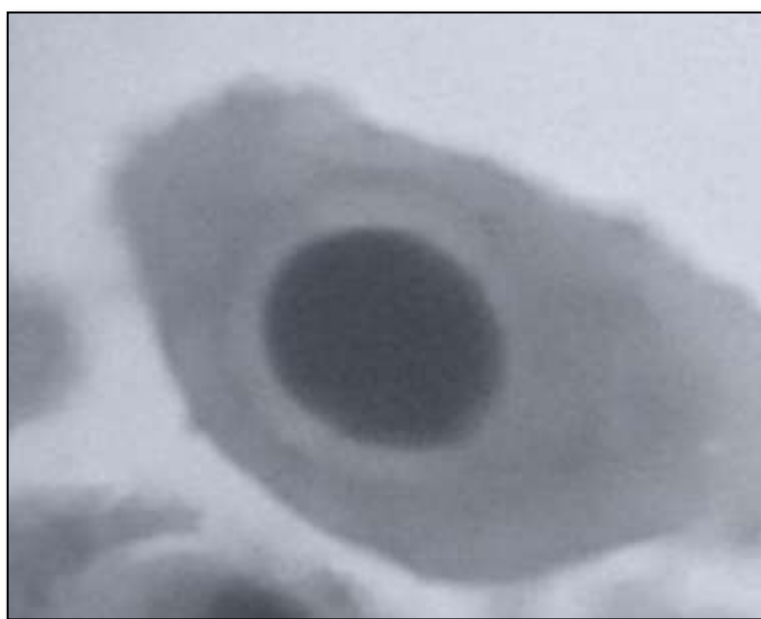


Figura 10. Ovocito de categoría 1 con 5 o más filas de células del cumulus y citoplasma homogéneo.

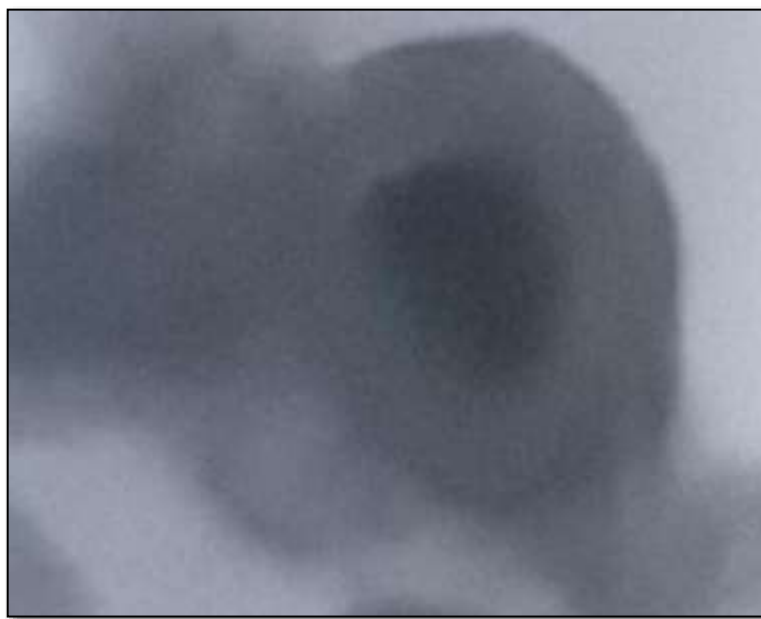


Figura 11. Ovocito categoría 1. De 5 a más filas de células del cumulus y citoplasma homogéneo.



Figura 12. Ovocito categoría 2: con citoplasma homogéneo y 3 filas de células del cumulus.

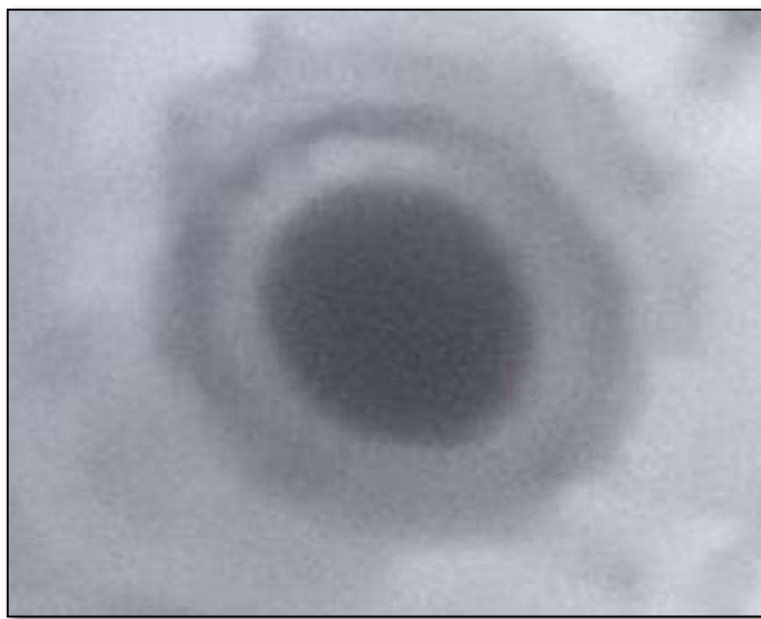


Figura 13. Ovocito categoría 3: con citoplasma homogéneo y menos de 3 filas de células del cumulus incompletas.

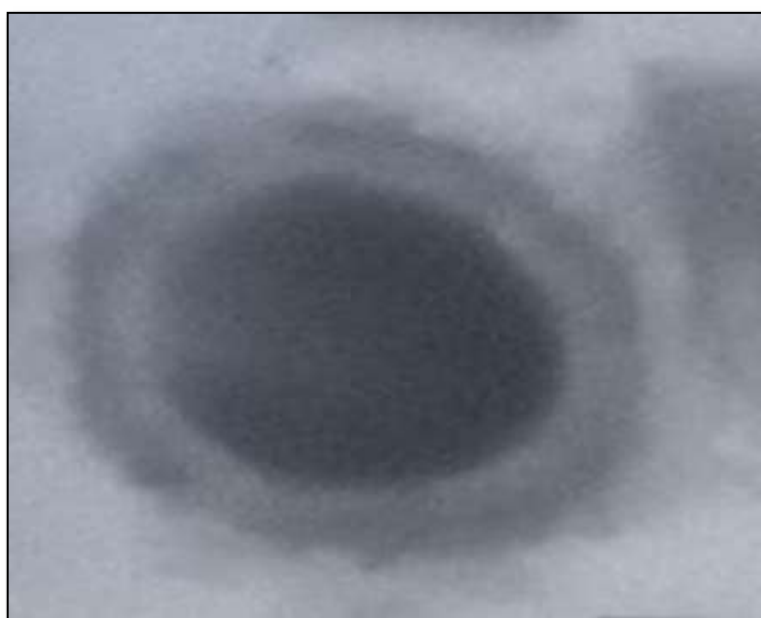


Figura 14. Ovocito categoría 4. Citoplasma homogéneo y desnudo.