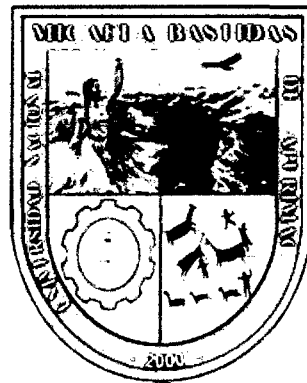


**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS
DE APURÍMAC**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE
RECUPERACIÓN DE COMPLEJOS
OVOCITOS -CÚMULUS (COCS) DE ALPACAS
POSTMORTEN**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO
VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

DIANA CHOQUE ROJAS

Abancay, Octubre de 2013

PERÚ



| UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURIMAC | |
|---|-----------------------|
| CÓDIGO | MFN |
| MVE Ch 2013 | |
| | BIBLIOTECA CENTRAL |
| FECHA DE INGRESO: | 23 DIC. 2014 |
| Nº DE INGRESO: | 00399 |



**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE
RECUPERACIÓN DE COMPLEJOS
OVOCITOS - CÚMULUS (COCs) DE ALPACAS
POSTMORTEN**



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

**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE
RECUPERACIÓN DE COMPLEJOS
OVOCITOS - CÚMULUS (COCs) DE ALPACAS
POSTMORTEN**

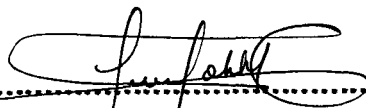
Jurado evaluador:



.....
MVZ. MSc. Víctor A. Ramos de la Riva
PRESIDENTE



.....
MVZ. MSc. Delmer Zea Gonzales
PRIMER MIEMBRO

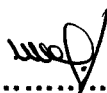


.....
MVZ. Filiberto Oha Humpiri
SEGUNDO MIEMBRO

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS
DE APURÍMAC**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE
RECUPERACIÓN DE COMPLEJOS
OVOCITOS - CÚMULUS (COCs) DE ALPACAS
POSTMORTEN**



.....
Mag.MVZ. Oscar Elisban Gómez Quispe

ASESOR



**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS
DE APURÍMAC**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

.....

Dr. Alejandro Narváez Liceras

RECTOR

.....

Ph.D. Ing. Lucy Marisol Guanuchi Orellana

VICERRECTORA ACADÉMICA

.....

Mag.MVZ. Lilian Roció Bárcena Rodríguez

DECANA DE LA FACULTAD



DEDICATORIA

A mis padres; Francisco Choque Rojas y Dominga María Rojas de Choque, porque creyeron en mí y me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, y hoy puedo ver alcanzada mi meta. Admiro vuestra fortaleza y por todo lo que han hecho de mí.

A mis hermanas; Nancy, Sara, Raquel y María Esther, por su apoyo, su comprensión, sus consejos y por haber fomentado en mí, el deseo de superación en la vida.

A todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso, sincero e incondicional apoyo.



AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque me ayudo en el camino y me ha dado la fuerza de seguir siempre adelante a pesar de todos los tropiezos que he tenido y enfrentado.

A mi querida alma mater, la "Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac" y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por todos los buenos momentos durante mi estancia como alumna.

A mis padres, por darme su apoyo siempre y por haberme guiado hacia el camino del bien; y a mis hermanas por su apoyo incondicional.

A mi asesor el MVZ. Oscar Elisban Gómez Quispe y esposa Lic. Fanny Henao López, por su apoyo y orientación hacia la finalización de mi tesis.

A mi amiga y compañera Naida Valverde Taipe por su apoyo y motivación en los primeros viajes de la investigación.

Al matadero de alpacas de la comunidad de Iscahuaca, distrito de Cotaruse, Aymaraes, Apurímac, por su apoyo incondicional.



INDICE

| | Pág. |
|--|------|
| RESUMEN | vi |
| SUMMARY | vii |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. MARCO TEORICO | 3 |
| 2.1. Antecedentes de la investigación | 3 |
| 2.1.1. Obtención y transporte de ovarios | 3 |
| 2.1.2. Mantenimiento de ovarios | 4 |
| 2.1.3. Métodos de recuperación de COCs | 5 |
| 2.1.4. Eficiencia de los métodos | 8 |
| 2.1.5. Búsqueda de Complejos Ovocito-Cúmulus (COCs) | 12 |
| 2.1.6. Clasificación de Complejos Ovocito-Cúmulus (COCs) | 13 |
| 2.2. Bases teóricas | 15 |
| 2.2.1. Distribución de camélidos sudamericanos | 15 |
| 2.2.2. Importancia de los camélidos sudamericanos | 15 |
| 2.2.3. Anatomía del ovario de alpaca | 17 |
| 2.2.4. Fisiología reproductiva de la hembra | 18 |
| 2.2.5. Endocrinología y dinámica folicular | 26 |
| 2.1.6. Características de los Complejos Ovocito-Cúmulus (COCs) | 30 |
| 2.1.7. El ovocito inmaduro | 31 |
| 2.3. Marco Conceptual | 33 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 35 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 41 |
| V. CONCLUSIONES | 49 |
| VI. RECOMENDACIONES | 50 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 51 |
| ANEXOS | 59 |



INDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|---|------|
| Tabla 01. DIMENSIONES OVÁRICAS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS | 18 |
| Tabla 02. CARACTERÍSTICAS DE LAS ONDAS FOLICULARES EN CAMÉLIDOS | 30 |
| Tabla 03. MÉTODOS DE RECUPERACIÓN (ASPIRACIÓN FOLICULAR Y SLICING) Y CATEGORÍA DE COCs DE ALPACAS POSTMORTEN. | 41 |
| Tabla 04. CANTIDAD DE COCs TOTALES BUENOS Y MALOS PARA MADURACIÓN IN VITRO (MIV) Y FERTILIZACIÓN IN VITRO (FIV) DE OVARIOS DE ALPACA. | 44 |
| Tabla 05. MÉTODOS DE RECUPERACIÓN, NÚMERO DE COCs POR OVARIO, Y NÚMERO COCs APTOS POR OVARIO DE OVARIOS DE ALPACA POSTMORTEN. | 47 |



ABREVIATURAS

| | | |
|-------------------------|---|---|
| COCs | : | Complejo ovocito-cúmulus |
| FIV | : | Fertilización in vitro |
| MIV | : | Maduración in vitro |
| FO | : | Folículo ovulatorio |
| GnRH | : | Hormona liberadora de Gonadotropinas |
| LH | : | Hormona Luteinizante |
| FSH | : | Hormona folículo estimulante |
| P₄ | : | Progesterona |
| PGF_{2α} | : | Prostaglandina F _{2α} |



RESUMEN

Con el objeto de comparar la categorización, condición y rendimiento de complejos ovocito-cúmulus (COCs) de alpaca post mortem por los métodos de slicing y aspiración folicular, se tomaron muestras de ovarios del matadero de la comunidad de Iscahuaca (Cotaruse, Aymaraes, Apurímac), para el método de aspiración folicular se usaron 98 ovarios de los cuales se tomaron solo los folículos visibles de 2 a 6 mm de diámetro utilizando una jeringa de 10 ml con una aguja de 21G x 1½ pulgadas, y luego se colocaron en un medio de lavado entre 5-10 ml en una placa de Petri graduada; con el método de slicing (incisión de la superficie del folículo del ovario) se emplearon 86 ovarios, los cuales se fijaron a una pinza hemostática curva para luego utilizando un bisturí incidir longitudinal y transversalmente todos los folículos visibles de 2 a 6 mm. Al comparar los métodos de aspiración folicular con el slicing, se obtuvieron por categoría 28.25, 34.92, 27.67 y 9.21% con 30.86, 37.04, 22.84 y 9.26% en las categorías I, II, III y IV respectivamente ($p>0.05$); con respecto a la condición buena de COCs se obtuvo 63.17 y 67.90% para aspiración folicular y slicing ($p>0.05$) respectivamente; asimismo los métodos de aspiración folicular y slicing proveen 3.21 y 3.77 COCs por ovario ($p<0.05$), así como 2.03 y 2.56 COCs aptos por ovario respectivamente ($p<0.05$). Los resultados permiten concluir que cualquiera de los métodos de aspiración folicular y slicing posibilitan similar recuperación COCs aptos según categoría, condición y rendimiento por ovario.

Palabras clave: Aspiración, slicing, ovocito, COCs, alpaca.



SUMMARY

In order to compare the categorization condition and performance of cumulus-oocyte complexes (COCs) alpaca post mortem by the methods of slicing and follicular aspiration samples slaughterhouse ovaries community Iscahuaca (Cotaruse, Aymaraes took Apurimac), to the method of follicular aspiration 98 ovaries which were used were taken only visible follicles from 2 to 6 mm in diameter using a 10 ml syringe with a needle of 21G x 1 ½ inches, and then placed in a medium washing between 5-10 ml in a Petri dish graduated, with the method for slicing (surface incision ovarian follicle) 86 ovaries were used, which were set to a curved hemostat and then using a scalpel longitudinal impact and transversely across the visible follicles between 2 and 6 mm. Comparing methods of follicular aspiration with slicing, were obtained by category 28.25, 34.92, 27.67 and 9.21% to 30.86, 37.04, 22.84 and 9.26% for Class I, II, III and IV respectively ($p > 0.05$), with respect to the good condition of COCs was obtained 63.17 and 67.90% for follicular aspiration and slicing ($p > 0.05$) respectively, also methods of follicular aspiration and slicing to provide 3.21 and 3.77 COCs per ovary ($p < 0.05$) and 2.03 and 2.56 suitable COCs per ovary, respectively ($p < 0.05$). The results suggest that either method of oocyte retrieval and slicing like COCs allow eligible under category, condition and yield per ovary.

Key words: Aspiration, slicing, oocyte, COCs, alpaca.



I. INTRODUCCION

La crianza de los camélidos domésticos como las alpacas, es una de las actividades de mayor importancia e impacto en el desarrollo socioeconómico de la población alto-andina de nuestro país, no solo por su capacidad de adaptación a las difíciles condiciones medioambientales (alturas sobre los 4000 msnm), sino por su utilización como una fuente alimenticia de proteína de origen animal (Huanca, 2007).

Cerca del 90% (3 592 249) de la población mundial de alpacas se encuentran en el Perú, a nivel del departamento de Apurímac se tiene 224 855 de alpacas (INEI, 2012). Los cuales constituyen el principal medio de sustento para muchos productores de escasos recursos (PROREAL, 2009).

Debido a la baja productividad de esta especie, se busca desarrollar biotecnologías que contribuyan en adelante a la mejora de la eficiencia reproductiva. Estudios han demostrado que la calidad de los Complejos Ovocito-Cúmulus (COCs) no varían cuando los ovarios son mantenidos en solución salina a temperatura entre 30 a 37°C hasta 8 horas (Lu, 1990); el desarrollo de los métodos de recuperación de complejos ovocitos-cúmulus de ovarios de alpaca postmortem en



matadero, pretende maximizar la cantidad de ovocitos aptos o buenos para maduración in vitro (MIV) y fertilización in vitro (FIV). Sin embargo, en los procesos de FIV en el futuro, ésta se realizará en alpacas de alta calidad genética, consiguientemente serán valiosos los métodos de recuperación en la obtención de COCs por animal y muchas veces por ovario, como ocurre en las especies en proceso de extinción; por lo que, se hace necesario evaluar la eficiencia de los métodos de recuperación de COCs del ovario de alpaca. En Camélidos Sudamericanos, existe una escasa información referida a la recuperación de COCs de ovarios de mataderos (Huanca, 2007).

La investigación se realizó con el objeto de comparar los métodos de aspiración y slicing en la categorización, condición y rendimiento de COCs recuperados de los ovarios de la alpaca procedentes de matadero.



II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

2.1.1. Obtención y transporte de ovarios

En vacunos, se colectaron ovarios de vacas (Calderón, 2005) y vacas Cebú (Ahuja *et al.*, 2009), inmediatamente después del faenado y eviscerado en el Frigorífico, luego se depositaron en un recipiente térmico con 1L de solución salina estéril (NaCl al 0.9%), adicionada con 100 mg de Estreptomina y 80 mg de Penicilina G Sódica a una temperatura de 30-35°C (González *et al.*, 1992a), 35-36°C (Ahuja *et al.*, 2009) ó 38°C (Calderón, 2005). Seguidamente se transportaron al laboratorio a las 2 a 3 h después de su colección (Ahuja *et al.*, 2009; González *et al.*, 1992a), ó 3 horas post faenamamiento (Calderón, 2005).

En alpacas, los ovarios obtenidos en matadero fueron recuperados y llevados en termos a temperatura ambiente al laboratorio, dentro de las tres horas siguientes al beneficio (Ruiz *et al.*, 2011).



En otro estudio, se obtuvieron ovarios de alpaca de diferente raza y luego fueron transportados hasta el laboratorio en un frasco térmico conteniendo solución salina fisiológica (NaCl al 0.9%) a 37°C (Gonzales *et al.*, 2009).

En la cerda, los ovarios provenientes de matadero, fueron depositados en un termo de 500 ml de NaCl al 0.9%, y preservado con antibiótico y antimicótico (Penicilina 10 000 U.I./ml, Estreptomicina 10,000 microgramos/ml y Anfotericina B 25 mg/ml). Luego fueron transportados al laboratorio a una temperatura de 25-30°C (Fernández *et al.*, 2010).

2.1.2. Mantenimiento de ovarios

En vacunos, una vez en el laboratorio, los ovarios se lavaron en solución fisiológica temperada a 38°C (Calderón, 2005) ó 38.5°C (Ahuja *et al.*, 2009). Posteriormente los ovarios se mantuvieron en baño María a 37°C en esta misma solución en un vaso de precipitado de 1000 ml (Calderón, 2005).

En alpacas, posteriormente a su recuperación, los ovarios son colocados en solución salina a 35°C, y luego una vez en el laboratorio son lavados con suero fisiológico a 35°C, seguidamente secados con papel toalla para proceder con el método de recuperación de COCs (Huanca *et al.*, 2007). En otro estudio realizado por Gonzales *et al.* (2009), una vez en el laboratorio, los ovarios se mantuvieron en baño María a 37°C en solución fisiológica (NaCl al 0.9%) en un vaso de precipitado de 1000 ml.



2.1.3. Métodos de recuperación de COCs

Para la producción *in vitro* de embriones, la eficiencia del método de recuperación y la clasificación de los COCs son un pre-requisito. Muchos métodos tales como la aspiración del material folicular, la disección de folículos aislados individualmente y el slicing de los ovarios han sido descritos para obtener ovocitos inmaduros de ovarios procedentes de matadero; estos métodos podrían incrementar el número de COCs recuperados comparado con la aspiración del material folicular (Alm y Torner, 1994).

a. Aspiración folicular

En el vacuno, para la recuperación de los ovocitos, se aspiraron todos aquellos folículos entre 2-8 mm de diámetro (Calderón, 2005) o los COCs de los folículos ováricos de 3 a 7 mm de diámetro (Ahuja *et al.*, 2009). La aspiración se realizó en forma manual utilizando una aguja de 18 G y jeringa de 10 ml la cual contiene solución salina fosfatada y buferada (PBS), adicionada con 0.3% de albúmina sérica bovina, 100 mg/litro de estreptomicina y 80 mg/litro de penicilina G sódica, a 37°C. El contenido de la jeringa se vierte en tubos cónicos graduados de vidrio de 15 ml, mantenidos en baño María a 37°C (Calderón, 2005). Después de un reposo de 10 min, se aspira cuidadosamente con una pipeta Pasteur el sedimento de cada tubo (González *et al.*, 1992b), luego son transportados a placas de Petri temperadas para vaciar su contenido (sedimento) cuya superficie inferior es previamente cuadrículado para facilitar la búsqueda de los COCs. Estas placas son mantenidas sobre una platina temperada a 37°C (Calderón, 2005).



En alpacas, una vez en el laboratorio, los ovarios fueron lavados con suero fisiológico a 35°C, luego secados en papel toalla, para proceder a la punción de los folículos mayores a 2 mm empleando una aguja 18 G; el líquido folicular aspirado fue colocado en tubos Falcón de 50 ml, reposando por 15 min para ser vertido en placas de Petri, y proceder a la búsqueda de los COCs en el estereoscopio, siendo luego trasladados a nuevas placas de Petri con solución salina fisiológica a 35°C, donde fueron evaluados y clasificados (Huanca *et al.*, 2007). Por su parte Ruiz *et al.* (2011), aspiraron folículos pequeños de 2-6 mm con ayuda de agujas de 21 G X 1 ½ en jeringas de 5 ml; el líquido folicular con los COCs recuperados se depositó en tubos de 15 ml, luego mantenido a 37°C y decantándose por 20 min. Se aspiró el sedimento, se depositó en placas de Petri y se diluyó en medio de oviducto sintético modificado suplementado con 25 mM HEPES (Takahashi y First, 1992) y 1 mg/ml de albúmina sérica bovina, para su posterior maduración in vitro. En otro estudio Gonzales *et al.* (2009), para la recuperación de los complejos ovocito-cúmulus (COCs) utilizó el método de aspiración folicular, utilizando una jeringa hipodérmica de 10 ml y una aguja de 21 G, para aspirar los folículos que oscilaban entre 4 - 6 mm, colocándolos en un tubo de polipropileno (50 ml) mantenido a una temperatura de 37°C en baño María; luego de 10 min de reposo, se extrajo el sedimento del fondo del tubo llevándolo a las placas de Petri, para su posterior maduración in vitro.

En la cabra, los folículos visibles de 2-6 mm fueron aspirados usando una aguja 18 G hipodérmica con una jeringa de 5 ml estéril que contenía 2 ml de medio; seguidamente los medios junto con COCs en reposo



fueron transferidos a una placa de Petri de 35 mm, luego fueron reposados durante 5 min, permitiendo a los COCs instalarse; los medios excedentes fueron extraídos por una jeringuilla sin interrumpir los COCs en el fondo de la placa de Petri (Hoque *et al.*, 2011).

En la cerda, los COCs obtenidos por el método de aspiración folicular, fueron aspirados de folículos de 3 a 5 mm, con una jeringa de 10 ml y aguja de 1 ½ calibre (1.20 mm x 38 mm), el contenido de las jeringas se vertió en tubos cónicos de 50 ml estériles, lo cual se dejó sedimentar media hora; el sobrenadante se depositó en una placa de Petri, seguidamente se procedió a buscar y seleccionar los COCs con citoplasma uniforme, rodeados de una masa compacta de células del cúmulus (Fernández *et al.*, 2005).

b. Slicing (Seccionamiento ovárico).

En el vacuno, los ovarios después de fijado en una pinza hemostática curva, superficialmente fueron incididos longitudinalmente y transversalmente con una hoja de bisturí. Para la recuperación de los COCs se lavaron por inmersión en solución salina fisiológica conteniendo 0.5 mg/ml de alcohol polivinílico. El líquido resultante fue pasado a través de una unidad de filtración EmCon, con el objeto de lavar y separar en forma simultánea los complejos ovocitos-cúmulus. El concentrado remanente de cada filtración fue vertido en placas de Petri de 100x100 mm (González *et al.*, 1992b).

En otro estudio, los ovarios de vacuno se fijaron a una pinza hemostática curva, luego con un bisturí se incidió longitudinal y transversalmente



cada folículo de 2-8 mm de diámetro visibles en la superficie del ovario, seguidamente fue sumergido para lavarse con una suave presión cada área seccionada en un medio de lavado entre 5-10 ml en una placa de Petri graduado y protegido de la luz (Gómez *et al.*, 2012).

En la cabra, por el método de slicing o corte, los ovarios fueron colocados en una placa de Petri que contenía 5 ml en medio de colección de COCs, con ayuda de fórceps. Las incisiones fueron realizadas a lo largo de la superficie ovárica usando una hoja de bisturí. Los medios de lavado junto con COCs en reposo fueron transferidos a una placa de Petri de 35 mm; las placas de Petri fueron dejados en reposo durante 5 min, permitiendo a los COCs sedimentarse, los medios excedentes fueron extraídos por una jeringuilla sin interferir a los COCs en el fondo de la placa de Petri (Hoque *et al.*, 2011).

En la cerda, para obtener los COCs mediante el método de slicing, se utilizó una hoja de bisturí estéril para realizar cortes sucesivos tanto longitudinales como transversales en los folículos de 3 a 5 mm, después de cortar se aplicó el medio (TLHEPES-PVA) para lavar la superficie de los ovarios; el fluido resultante se depositó en una placa de Petri y se vertió en tubos cónicos de 50 ml estériles, posteriormente se dejó sedimentar media hora, se extrajo el sobrenadante y se hicieron tres lavados posteriores con el mismo medio a intervalos de 15 min. El paquete celular se depositó en una placa de Petri, luego se procedió a la búsqueda y selección de COCs con citoplasma uniforme y rodeados de una masa compacta de células del cúmulus (Fernández *et al.*, 2010).



2.1.4. Eficiencia de los métodos

En vacunos, por el método de slicing se obtuvieron una mayor proporción de COCs y de excelente calidad comparado con el método de aspiración. La disminución en las tasas de recuperación en el caso de aspiración folicular puede estar asociada a efectos nocivos sobre las capas de las células del cúmulus ejercidas por la fuerza de la aspiración. El mayor número de COCs obtenidos por el método de corte seriado puede estar explicado por la recuperación de COCs provenientes de folículos menores de 2 mm de diámetro que están en el interior del ovario; sin embargo, estos COCs tienen poco potencial para sufrir maduración meiótica y desarrollo embrionario comparado con los COCs recuperados de los folículos presentes en la superficie del ovario, ya que los COCs de folículos internos pueden no haber adquirido aun la competencia para la maduración y desarrollo (Velarde y Gandarillas, 2005).

En otro estudio, al comparar los métodos de aspiración folicular y slicing, se obtuvieron por categoría 27.70, 21.13, 27.70 y 23.47% con 28,42, 17.89, 27.37 y 26.32% en las categorías A, B, C y D, respectivamente; con respecto a la calidad de COCs obtuvo 46.24 y 48.83% para aspiración folicular y slicing respectivamente; asimismo los métodos de aspiración folicular y slicing proveen 4.26 y 5.32 COCs por ovario, así como 2.46 y 2.08 COCs aptos por ovario, considerados buenos para maduración in vitro y fertilización in vitro (Gómez *et al.*, 2012).

Asimismo, con el método de aspiración folicular hallaron 40.3, 48.3 y 10.9% para las categorías A, B y C, respectivamente, y con el método de slicing



encontraron 59.3, 33.0 y 7.5% de COCs para las respectivas categorías, recuperando diferentes cantidades de COCs por categoría y por método de recuperación de COCs, logrando encontrar un total de 88.6% COCs de calidad con el método de slicing y con aspiración folicular fue 92.3% (González *et al.*, 1992a).

En otro estudio al aplicar el método de aspiración folicular, se tomó en cuenta los COCs de clase A y B como de calidad cultivable para su maduración *in vitro*, se obtuvo un rendimiento de 342 (88.3%) de COCs potencialmente cultivables respecto a 42 (10.9%) de COCs clase C no aptos (González *et al.*, 1992b).

Asimismo, se hallaron más COCs por el método del slicing que por aspiración folicular (63.3 y 22.1%); y la proporción de COCs de categoría A también fue mayor para el método de slicing (84.6 y 41.3%) que para el método de aspiración folicular; en ambos casos estaría explicado por la recuperación de COCs de la zona superficial y cortical (folículos < 2 mm de diámetro) del ovario al usar el método de slicing y el uso de aguja 18 G para la aspiración folicular (Hamano y Kuwayma.,1993).

Así como, al comparar la aplicación de los métodos de recuperación de COCs como la aspiración folicular y seccionamiento (slicing), el número de COCs bovinos buenos (clase A) fue 95.2 ± 48.92 y 28.8 ± 21.5 y malos (clase B) fue 122.6 ± 54.71 ; 70.0 ± 47.86 respectivamente. Estos resultados indican que el método de slicing produce un número mayor de ovocitos malos por ovario. Se atribuye esta condición como un factor del método de recolección de poblaciones



heterogéneas de ovocitos de todos los folículos pequeños en el estroma ovárico y que muchos de estos ovocitos no sean desarrollado (Hernández *et al.*, 2010).

Mediante la aplicación del método de aspiración folicular, de ovarios de vacuno se obtuvo un promedio de recuperación de 26.13% fueron de categoría A, el 21.72% categoría B, el 47.30% categoría C y el 4.85% categoría D, obteniendo un promedio de recuperación de 6.11 COCs por ovario, tomando folículos de 2-8 mm (Zarate, 2006).

En la cabra, se obtuvieron para el método de slicing 1.24 ± 0.07 , 0.67 ± 0.09 , 0.94 ± 0.07 y 1.28 ± 0.13 , para las categorías A, B, C y D, respectivamente y con el método de aspiración folicular encontraron 2.29 ± 0.08 , 0.57 ± 0.08 , 0.63 ± 0.08 y 0.17 ± 0.12 de COCs para las respectivas categorías, habiéndose recuperado diferentes cantidades de COCs por categoría y por método de recuperación de COCs, el número total de COCs por ovario obtenidos por los métodos de slicing y aspiración folicular fue de 4.14 y 3.28. En este estudio para el método de slicing las incisiones eran fueron dadas a lo largo de la superficie ovárica entera usando una hoja de bisturí, para el método de aspiración solo se tomaron los folículos vesiculares de 2 a 6 mm con una aguja hipodérmica 18 G (Hoque *et al.*, 2011).

En alpacas, por el método de aspiración folicular se encontraron una tasa de recuperación de 68.6 y 54.5% transportando los ovarios recuperados en solución salina a 35°C y 4°C desde el faenamiento hasta el laboratorio, respectivamente. Asimismo, en el grupo que fueron transportados a 35°C se lograron 54 y 46% de ovocitos aptos y no aptos, respectivamente; y en el grupo



que fueron transportados a 4°C se lograron 36 y 64% de COCs aptos y no aptos (Huanca *et al.*, 2007).

Mediante el método de aspiración folicular recolectaron en promedio 3.5 complejos ovocito-cúmulus (COCs) por ovario de alpaca, recuperándose 667 COCs, y siendo seleccionado el 69% de ellos como apto para la maduración *in vitro* (Ruiz *et al.*, 2011). Se consideraron como aptos cuando tenían dos o más capas de células de la granulosa rodeando al ovocito y con un citoplasma de color homogéneo, siendo descartados los ovocitos con cúmulo expandido, parcial o totalmente desprovistos de células de la granulosa (Ratto *et al.*, 2005).

Empleando el método de aspiración folicular recuperaron un total de 180 COCs, aunque hubo ovarios en donde no se pudo recuperar COCs, ya que estos presentaban quistes luteales y/o foliculares y en algunos casos los animales se encontraban en estado de anestro. Con respecto a la selección de los COCs, solamente se seleccionó 80 (44.4%), debido a que muchos de los COCs recuperados presentaban características anormales como el citoplasma heterogéneo y ovocitos sin simetría. Sin embargo los COCs que fueron seleccionados presentaban muchos indicadores morfológicos óptimos como el cúmulus parcial y total, citoplasma homogéneo y simetría normal respectivamente (Gonzales *et al.*, 2009).

2.1.5. Búsqueda de Complejos Ovocito - Cúmulus (COCs)

En el vacuno, los COCs se buscaron con un estereoscopio a un aumento de 20X ó 40X, una vez identificados fueron depositados en una placa de



Petri la cual contenía PBS mantenida sobre la platina temperada a 37°C (Calderón, 2005). El fluido folicular conteniendo COCs con al menos dos capas de células del cúmulus intactas y con citoplasma granuloso homogéneo se transfirieron a una placa de Petri, para iniciar el proceso de maduración (Ahuja *et al.*, 2009).

En la alpaca, se seleccionaron los COCs bajo un microscopio estereoscópico; el fluido folicular contenía COCs de dos o más capas de células de la granulosa rodeando al ovocito y con un citoplasma de color homogéneo, siendo descartados los COCs con cúmulus expandido, parcial o totalmente desprovistos de células de la granulosa (Ruiz *et al.*, 2011).

2.1.6. Clasificación de Complejos Ovocito - Cúmulus (COCs)

En alpacas, utilizando una clasificación empleada en gatas, los COCs se clasificaron de la siguiente manera: Ovocitos categoría I o excelentes (presentan citoplasma oscuro uniforme combinado con cinco o mas capas compactas de cúmulus), Ovocitos categoría II o buenos (presentan citoplasma oscuro uniforme, conjuntamente con una corona radiada completa pero menos de cinco capas del cúmulus), Ovocitos categoría III o regulares (presentan una pérdida de la uniformidad del citoplasma, la corona radiada se presenta incompleta y las capas del cúmulus presentes son menos compactas) y Ovocitos categoría IV o malos (presentan citoplasma no homogéneo o francamente fragmentado y las células de la corona y del cúmulus se encuentran disgregadas o ausentes en su totalidad) (Huanca *et al.*, 2007).

Asimismo, se clasificó a los COCs por sus características, mediante las siguientes categorías: Categoría I (COCs con 5 o más capas compactas de células



del cúmulus y citoplasma homogéneo), Categoría II (COCs con 2-4 capas compactas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo), Categoría III (1 capa o menos de células de la granulosa o parcialmente denudado y/o citoplasma vacuolado) y Categoría IV (ovocito denudado y/o citoplasma granular) (De Loose *et al.*, 1989).

Así como, se tomaron en cuenta indicadores morfológicos en el cúmulus como el número de capas compactación y transparencia en el citoplasma del ovocito (color, densidad y tamaño de los gránulos) (Gonzales *et al.*, 2009).

En los vacunos, se propuso el siguiente esquema de clasificación de acuerdo a la apariencia de las células del cúmulus y del ovoplasma: De Categoría 1 (presentan tres capas compactas de células del cúmulus que los rodean en toda su superficie), Categoría 2 (se presentan rodeados parcialmente por tres capas compactas de células del cúmulus), Categoría 3 (se encuentran rodeados por células del cúmulus expandidas), Categoría 4 (ovocitos denudados) (Leibfried y First., 1979).

En otro estudio, se clasificaron a los COCs de la siguiente manera: Clase A (ovocitos compactos con células del cúmulus denso), clase B (ovocitos parcialmente denudados con cúmulus delgado o pequeños remanentes de células del cúmulus) y Clase C (ovocitos denudados). Asimismo Gonzales *et al.* (1992a), clasificaron a los complejos ovocito-cúmulus en: COCs A (cúmulus denso y compacto), COCs B (parcialmente denudados con un estrato delgado de células o un pequeño remanente de células del cúmulus), COCs C (denudados o desprovistos del cúmulus ooforus) (Shioya *et al.*, 1988).



En Ovinos, para evaluar la calidad de los complejos ovocito- cúmulus (COCs) previamente clasificó en Clase A (completamente rodeados por células del cúmulus), Clase B (parcialmente rodeados por células del cúmulus) y Clase C (ovocitos denudados) (Escobar, 2007).

En la cabra, se clasificó los COCs en 4 categorías sobre la base de células de cúmulus y núcleo, como: Grado A (ovocitos completamente rodeado por células de cúmulus), Grado B (el ovocitos parcialmente rodeado por células del cúmulus), Grado C (ovocitos no rodeado por células del cúmulus) y Grado D (degeneración observada tanto en ovocitos como células de cúmulus) (Hoque *et al.*, 2009).

En la cerda, se seleccionaron complejos ovocito-cúmulus de citoplasma uniforme y rodeados de una masa compacta de células del cúmulus (Fernández *et al.*, 2010).

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Distribución de camélidos sudamericanos

La población de alpacas se encuentra en el Perú (3 592 249), donde la mayoría se encuentran en los departamentos de la sierra sur, particularmente Puno, Cusco, Huancavelica, Arequipa y a nivel del departamento de Apurímac se tiene 224 855 de alpacas (INEI, 2012). El 80% de la producción de camélidos sudamericanos se desarrolla en las regiones andinas de Ecuador, Perú, Bolivia, Argentina y Chile (Huanca, 2007).



2.2.2. Importancia de los camélidos sudamericanos

En la actualidad la crianza de los camélidos domésticos constituye una de las actividades de mayor importancia e impacto en el desarrollo socioeconómico de la población alto andina del Perú. Estos animales han adquirido a lo largo del tiempo una notable capacidad de adaptación a las difíciles condiciones medioambientales existentes en estos territorios. El hábitat natural de la alpaca son los ecosistemas andinos localizados entre los 3 800 y 5 000 metros sobre el nivel del mar, cuyos pastos son muy pobres en nutrientes debido a las condiciones del suelo y la erosión; las alpacas son capaces de alimentarse en estos pastos, que además, presentan un elevado contenido en taninos, toleran las bajas temperaturas y las inclemencias meteorológicas y son más resistentes a las infestaciones parasitarias que las vacas y ovejas. Bajo estas condiciones adversas producen fibra de una calidad excepcional y proteínas de origen animal destinadas al consumo humano, en zonas geográficas en las que no es viable la explotación de otras especies domésticas. Al menos un millón y medio de personas se dedican a la crianza de camélidos en la región alto-andina del Perú. Las áreas productoras de camélidos sudamericanos en el Perú incluyen las provincias con mayor pobreza y marginalización; sin embargo, esta producción aun no representa una vía directa para reducir la pobreza y marginalización de sus productores, a pesar de la demanda incrementada por los sub productos de esta especie (Huanca, 2008).

Lo anterior refleja un contexto de producción complejo, afectado por la limitada disponibilidad y el uso no conservativo de los recursos naturales que



determinan baja productividad de los rebaños de alpacas, pequeñas escalas de producción y una débil integración de las cadenas productivas con las del mercado (De Los Ríos, 2006).

2.2.3. Anatomía del ovario de alpaca

El tamaño y la forma de los ovarios varían con la edad y con su contenido de folículos y cuerpos lúteos. Así, su longitud oscila entre los 5 y 12 mm y su peso entre los 1.9 y 2.4 g (Sato y Montoya, 1990; Sumar, 1985). En las hembras multíparas los ovarios son ovalados o circulares y aplanados lateralmente, y presentan una superficie irregular debida a la presencia de numerosos folículos cuyo diámetro está comprendido entre los 3 y 5 mm. La presencia de folículos maduros y, sobre todo, de cuerpos lúteos le confiere al ovario un aspecto lobulado. Cada ovario está rodeado completamente por un largo pliegue del mesosalpinx con forma cónica denominado *bursa ovarii*, cuya porción apical forma un amplio orificio circular que comunica con la fimbria del oviducto (Bravo, 2000).

En llamas, los folículos varían en diámetro, desde pequeñas estructuras de 3 mm dispuestas alrededor de la periferia del ovario y los folículos pre-ovulatorios son de 7 a 16 mm de tamaño, con una media de 10.6 mm de diámetro, los que sobresalen de la superficie del ovario (Adams *et al.*, 1989).

Los ovarios se ubican en la cavidad abdominal, perpendicular a la séptima vértebra lumbar suspendidos por el mesovario, dispuestos dorso lateralmente a los cuernos uterinos (Solís, 1997).

Tabla 01. DIMENSIONES Y PESO DE OVARIOS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

| Ovario | Alpaca | Llama | Vicuña | Guanaco |
|-------------------------|---------------|--------------|---------------|----------------|
| Ovario derecho | | | | |
| Longitud (cm) | 1.6 ± 0.3 | 1.3 - 2.5 | 1.3 | 1.5 |
| Profundidad (cm) | 1.1 ± 0.2 | 1.4 - 2.0 | 0.7 | - |
| Ancho (cm) | 1.1 ± 0.2 | 0.6 - 1.0 | 1.0 | - |
| Ovario izquierdo | | | | |
| Longitud (cm) | 1.6 ± 0.3 | 1.5 - 2.5 | 1.2 | - |
| Profundidad (cm) | 1.1 ± 0.2 | 1.5 - 2.5 | 0.7 | - |
| Ancho (cm) | 1.1 ± 0.2 | 0.5 - 1.0 | 1.0 | - |
| Peso (g) | 1.4 | 2.4 | 1.2 | - |

Fuente: Adaptado de Bravo, (2002).

2.2.4. Fisiología reproductiva de la hembra

a. Pubertad

La pubertad, en los mamíferos, se alcanza cuando el animal es capaz de liberar gametos y de manifestar comportamiento sexual. Si bien los mecanismos endocrinológicos sobre el inicio de la pubertad no se han descrito en camélidos sudamericanos, en otras especies se sugiere que la inactividad hipotalámica es la responsable de mantener el estado prepuberal; evidencias señalan que en bovinos y ovinos existe un efecto de retroalimentación negativa de los estrógenos ováricos antes de la pubertad sobre el pulso generador de GnRH (Kinder *et al.*, 1987); pero conforme se acerca la pubertad este efecto disminuiría, convirtiéndose paulatinamente en un mecanismo de retroalimentación positiva

provocando el aumento de las concentraciones circulantes de gonadotropinas, por incremento en amplitud y frecuencia de sus pulsos periódicos, necesarios para la maduración folicular y ovulación (Hafez, 1996).

En bovinos, la pubertad ocurre hacia los 12 meses de edad, en ovinos a los seis o siete meses (Hafez, 1996); tiempo que estaría influenciado por el efecto de la nutrición sobre la maduración sexual. Estudios señalan que la subnutrición sería un inhibidor de la secreción pulsátil de LH al reducir la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), secreción que estaría relacionada con la información del estado metabólico del animal (Schillo, 1992) que se sugiere sería brindado por la leptina al sistema nervioso central (Mantzoros, 2000), de este modo la leptina serviría como una señal para el inicio de la pubertad (Baldelli *et al.*, 2002), al estar relacionada con la activación del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal cuando el nivel energético corporal en el animal es el adecuado para desempeñar una función reproductiva normal (Mantzoros, 2000).

En las alpacas a partir de los 12 meses de edad, se puede mostrar actividad sexual seguida de ovulación y fertilización (Novoa *et al.*, 1972), donde el inicio de la pubertad se relaciona más estrechamente con el peso corporal, por lo que se recomienda un peso no menor a 36 kg para obtener tasas de natalidad similares a las de adultos (Sumar, 1983).

b. Comportamiento sexual

La alpaca hembra en estado de receptividad sexual, al ser requerida por el macho se deja montar y adopta una posición decúbito ventral aceptando la



cópula, a veces algunas intentan escapar pero luego de varios intentos del macho lo aceptan, mientras otras se acercan a una pareja en cópula, huelen al macho y se echan a su lado (Fernández Baca, 1971). La alpaca asume una actitud muy pasiva durante la cópula (Sumar, 1997).

Los camélidos no presentan un ciclo estral definido que sea comparable en otras especies (Novoa, 1992; Zúñiga, 1958; Rodríguez, 1959). Se ha observado que a partir de los 12 meses de edad en alpacas muestran una conducta sexual similar a las adultas de 2 a más años de edad (Novoa, 1972). Las alpacas o llamas hembras, en ausencia de la estimulación copulatoria, muestran periodos de receptividad sexual hasta de 40 días, con breves periodos de rechazo al macho, que puede durar 48 horas (San Martín *et al*, 1968); esta actividad probablemente se debería a ondas foliculares continuas de larga duración con presencia aparentemente continua de un folículo estrogénico y su consiguiente secreción de estrógenos (Novoa, 1989; Fernández Baca, 1993).

La duración de la cópula es variable, en empadre libre se registra 8.1 ± 5.4 min y en empadre controlado 17.5 ± 12.1 min (Novoa, 1991); a veces se prolonga por más de 50 min (Fernández Baca, 1971).

La receptividad sexual en alpacas parecería estar en relación con el grado de desarrollo de los folículos (Fernández Baca, 1971). La inexperiencia sexual de la hembra también afecta el comportamiento de receptividad (Pollard *et al.*, 1995) y las hembras no receptivas escapan del macho, escupen y patean (Sumar, 1997). La no receptividad es una característica diferencial entre hembras preñadas y vacías; puesto que se considera que dentro de los 18 a 20 días



posteriores a la monta, cuando la receptividad no está presente es debido a la preñez (Fernández-Baca, 1971), por el efecto inhibitorio de la progesterona. En relación a la efectividad de determinar preñez en llamas mediante conducta sexual a los 16 días post servicio, ésta fue de 76.2% al compararla con el diagnóstico ecográfico a los 17 días post servicio (Cárdenas *et al.*, 2001).

En otro estudio, se encontraron que a los cuatro primeros días posteriores al parto las hembras pueden ser receptivas al macho y copular, sin embargo la fertilización se logró sólo a partir de los 5 días en un 30%, mientras que a los 10 días en un 70% (Sumar *et al.*, 1972). Asimismo, el porcentaje de ovulación fue mayor en hembras con un período postparto 20 días (Bravo *et al.*, 1995a). La involución uterina completa fue observada en un 63% de hembras a los 21 días postparto (Bravo *et al.*, 1995b).

c. Ovulación

Los camélidos son especies de ovulación inducida por la cópula, su estímulo proporciona el impulso nervioso necesario para desencadenar la secreción hipofisaria de la hormona luteinizante (LH), responsable de causar la ruptura folicular y la consiguiente liberación del óvulo (Fernández Baca, 1971). Estudios en bovinos señalan que previo al proceso de ovulación ocurre disociación y descomposición progresiva de diversas capas celulares que rodean el ápice del folículo pre-ovulatorio como resultado de las actividades de enzimas proteolíticas producidas por las células de la granulosa, por fibroblastos circulantes o por ambos en respuesta a LH, progesterona (P₄) y prostaglandina (Hafez, 1996); debido a que cuando la ovulación es inminente, se produce un



incremento progresivo de las células apoptósicas, en la superficie epitelial del ovario, túnica albugínea, y pared apical del folículo (Murdoch, 1995).

La ovulación puede ocurrir 26 a 30 horas después de la cópula (San Martín *et al.*, 1968) o puede ser inducida artificialmente entre las 24-30 horas pos inyección de gonadotropina corionica humana (hCG), de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y de LH (Fernández Baca, 1971; Huanca *et al.*, 2001). La ocurrencia de ovulación en llamas se reporta independiente del tipo de monta o del estado de lactación (Adams *et al.*, 1990); concordando con resultados de Bravo y Sumar (1985), en alpacas.

El semen total de alpaca y toro aplicados intra-vaginalmente tienen un factor de inducción de ovulación en alpacas en receptividad sexual, señalándolo como un nuevo mecanismo de ovulación, aunque sus efectos sobre el sistema endocrino y fisiológico de la hembra alpaca o llama aún no se conocen (Ríos *et al.*, 1985). Asimismo, se ha reportado un 5 a 10% de ovulaciones espontáneas en alpacas que no fueron privadas totalmente de estímulos visuales, olfatorios y auditivos del macho (Sumar, 2000); o hasta un 42.86% frente a la sola presencia del macho. El incremento de las concentraciones de LH, ha sido observado 15 min después de iniciada la cópula y a las 2 horas en el pico pre-ovulatorio (3-8 ng/ml); volviendo a su nivel basal (0.96 ng/ml) a las 7 horas; también se observó que dentro de las 24 horas, una segunda cópula no provoca una liberación significativa de LH (Bravo *et al.*, 1992). Sin embargo, esto último contrastaría con los resultados obtenidos por Sumar y Alarcón (1989) en tasas de natalidad versus el número de servicios, ya que estas tasas fueron superiores en alpacas que



recibieron dos servicios frente a las de un solo servicio. Asimismo, se encontró que en alpacas que recibieron copulaciones adicionales en los días 3 y 4 post ovulación hubo una tendencia porcentual de mayor sobrevivencia embrionaria y de preñez (Aparicio, 2001).

La cópula es relativamente larga en los camélidos sudamericanos y con períodos variables (Sumar, 1997). Existen trabajos que refieren que a mayor tiempo de duración de la cópula se obtiene mayor porcentaje de alpacas que ovulan, sin embargo se ha encontrado que en varios casos hembras con más de 20 min no llegan a ovular mientras que otras con 5 min si lo hacen (Vivanco *et al.*, 1985).

Existen fallas ovulatorias post cópula, que no han sido totalmente explicadas, señalándose que podría ser atribuida a una sensibilidad disminuida de los folículos a los niveles circulantes de LH debido a las variaciones en los estadios de maduración folicular (Fernández Baca, 1971; Novoa, 1989).

En un estudio se señala que hembras con folículos pequeños liberaron menores cantidades de LH (29.1 ng/ml/6h) comparados con aquellas con folículos mayores en maduración (55.1 a 62.4 ng/ml/6h) o en regresión (63.7 ng/ml/6h), y que no ocurrió ovulación en aquellas con folículos menores a 7mm de diámetro al momento de la cópula (Bravo *et al.*, 1991), esto último estaría relacionado con la adquisición de los receptores de LH a estados avanzados del desarrollo folicular (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

En vacunos se conoce que el balance energético negativo decrece la secreción pulsátil de LH, afectando el crecimiento folicular y la oportunidad de



que se presente ovulación ya que no ocurre el pico pre-ovulatorio de LH (Schillo, 1992).

En otro estudio se señala a la edad como un factor importante de falla de ovulación, llegando a ser de 74% en alpacas de un año de edad con pesos 35 kg frente a un 23 a 31% en alpacas adultas (Bravo y Sumar., 1985).

Después de la ovulación se forma el cuerpo lúteo, indicado por su presencia se señala que la actividad ovulatoria es similar entre ovario derecho e izquierdo en llamas (Sumar y Leyva, 1979) y alpacas (Fernández Baca, 1971). Ovulaciones múltiples, en la mayoría dobles, ocurren en un 10% de alpacas después de la cópula (Fernández-Baca, 1971) y en un 20% después de la inyección de hCG (Fernández-Baca, 1993), pero partos múltiples en raras ocasiones, siendo en llamas el nacimiento de mellizos más frecuente que en alpacas pero sin dejar de ser ocurrencias eventuales (Sumar, 1997).

d. Cuerpo Lúteo

Producida la ovulación, se da inicio a la organización estructural y funcional del cuerpo lúteo (CL) por acción de la LH; las células tecales se luteinizan para dar lugar a las células luteales pequeñas, además se produce la hipertrofia y luteinización de las células de la granulosa dando lugar a las células luteales grandes; ambas células luteales son responsables de secretar progesterona (P_4) (Hafez, 1996).

El CL aumenta gradualmente de tamaño y actividad secretoria de P_4 , existiendo correlación entre sí (Fernández-Baca, 1971); siguiéndose un patrón



similar de P₄ en llamas y alpacas, aunque para el día 4 las concentraciones sean significativamente más altas en las últimas (Aba *et al.*, 1995).

En alpacas el CL alcanza su máximo diámetro (14 mm) en los días 8-9 post cópula o post inyección de hCG declinando marcadamente en ausencia de preñez para el día 12 y la regresión completa se observa el día 18; así mismo, la concentración de progesterona es elevada en el día 8 (4.41 ± 0.36 ng/ml), declinando hacia el día 18 a 0.23 ± 0.04 ng/ml; en alpacas preñadas ocurre un comportamiento similar hasta el día 8, pero se produce una declinación alrededor del día 13 y posteriormente los valores se recuperan entre el día 18 y 23 (Fernández-Baca *et al.*, 1970).

En llamas, con el uso de ultrasonografía, se observó que el CL alcanza su máximo diámetro en los días 5.9 (13 mm) y 21,4 (16 mm) post ovulación en no preñadas y preñadas respectivamente; habiendo en ambas una caída de progesterona en el día 8 post ovulación, que se recupera después del día 10 en preñadas (Adams *et al.*, 1991). Aba *et al.* (1995) señala que una disminución transitoria en las concentraciones de P₄ fue observada en llamas y alpacas preñadas entre los días 8 y 18 post ovulación. La caída momentánea de P₄ representaría la iniciación de la regresión luteal inducida por el útero, donde se sugiere que la prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α}) podría estar involucrada (Fernández-Baca, 1993), pero que sería rescatada tanto por el embrión presente y en desarrollo (Sumar, 1997) quien produciría una señal para su reconocimiento maternal (Aba *et al.*, 1995) y por la acción de un mecanismo antiluteolítico en los días 10 - 12 post monta que protegería al CL (Aba *et al.*, 1997).



En alpacas y llamas no preñadas, un incremento de la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ se observó desde el día 9 al 12 post cópula alcanzando picos de valor alto; en animales preñados el incremento fue lento, pero el día 24 alcanzó valores considerablemente altos comparados con los registrados en el día 4 (Aba *et al.*, 2000).

En otro estudio encontraron que la prostaglandina exógena afecta la vida del CL cuando se administra después del día 4 de la fase luteal inducida, sugiriendo que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ es el agente luteolítico en camélidos (Leyva y García, 1999b).

El eje hipotalámico hipofisario de la alpaca es sensible al efecto inhibitorio de la P_4 y los días de receptividad sexual que normalmente presentan las alpacas después de la ovulación se sugiere sean porque los niveles de P_4 secretados por el CL son aún insuficientes para ejercer el efecto inhibitorio (Leyva y García, 1999a). Al día 5 post ovulación desaparece la conducta de receptividad al macho, continuando así durante la permanencia activa del CL; si no ocurre fertilización, el CL involuciona a partir del día 13 post ovulación, retornando la receptividad al macho (Fernández Baca, 1971).

2.2.5. Endocrinología y dinámica folicular

a. Eje hipotálamo-hipofisario-gonadal en la hembra

El control de la reproducción en la hembra está determinado por una compleja interacción entre hormonas hipotalámicas, hipofisarias y gonadales. Estudios en bovinos y ovinos sugieren que la leptina estimularía la activación del



eje, al servir como señal para el sistema nervioso cuando las reservas críticas de grasa sean adecuadas para la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (Mantzoros, 2000; Baldelli *et al.*, 2002). La hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es secretada en forma pulsátil desde el hipotálamo y desempeña un rol clave en los procesos reproductivos, actuando sobre receptores de membrana específicos situados en las células gonadotrofas de la hipófisis y de este modo controlar la síntesis y secreción de las gonadotropinas, hormona foliculo estimulante (FSH) y hormona Luteinizante (LH) responsables de estimular la esteroidogénesis y gametogénesis (Brooks y McNeilly, 1996). En las especies de ovulación inducida, como los camélidos, la estimulación coital provoca un reflejo neuro endocrino que activa el centro de la GnRH, permitiendo una secreción pulsátil de LH (Arthur, 1991); sin embargo no se afecta la secreción de FSH (Bravo *et al.*, 1991).

La FSH es una hormona esencial para el inicio del desarrollo y mantenimiento de los folículos ováricos en los mamíferos, en presencia de LH estimula la secreción de estrógeno por los ovarios; la LH estimula la producción de testosterona en la teca interna y la FSH estimula la aromatización de testosterona a estrógeno en las células granulosas del folículo ; el incremento de la concentración de estrógeno circulante tiene un efecto positivo sobre el hipotálamo, dando por resultado la secreción pre ovulatoria de LH y FSH (Hafez, 1996). El rol principal de ésta secreción de LH es la inducción de la ovulación, luego de la cual las células del folículo ovulatorio se luteinizan y empieza la secreción de P_4 , la cual tiene un efecto de retroalimentación negativa en el hipotálamo, al prevenir la secreción de GnRH y desensibilizar a los gonadotrofos a la acción de la GnRH (Stevenson, 1997).



Cuando no ocurre fertilización, durante el período de actividad del CL, los estrógenos producidos por los folículos dominantes inducirán el aumento de receptores de Oxitocina en el útero, la Oxitocina estimulará la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el útero y se desencadenará la luteólisis (Leyva, 1996). La retroalimentación positiva de la cascada de Oxitocina desde el CL al útero y de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ desde el útero al CL probablemente sirve como un mecanismo que asegura la luteólisis. Producida la luteólisis los niveles de P_4 declinan permitiendo el resurgimiento de los niveles de LH (Stevenson, 1997).

b. Dinámica folicular en camélidos sudamericanos

En los camélidos sudamericanos se observa el desarrollo de ondas foliculares cíclicas, relacionado con el crecimiento, maduración y atresia del folículo dominante (Bravo y Sumar, 1989). Las tres fases o estadios descritos son crecimiento, maduración y regresión (Bravo *et al*, 1990). En el estadio de maduración o estático el folículo dominante inhibe el desarrollo de los folículos más pequeños (Bravo *et al*, 1990), reportándose una relación inversa entre el diámetro del folículo dominante y el número de folículos pequeños (Adams *et al*, 1990). El folículo dominante parece controlar su duración (Adams, 2001), puesto que si no hay ovulación se atresia, reconociéndose un nuevo folículo 2 a 3 días después de la primera disminución de tamaño del folículo dominante (Bravo *et al*, 1990).

El desarrollo de la onda folicular en alpacas se da de manera alterna en ambos ovarios, esto se comprueba con la presencia del folículo dominante en ambos ovarios en un 85% (Fernández-Baca, 1993) en donde uno de los ovarios



presenta folículos de tamaño ovulatorio mientras que en el otro van creciendo otros folículos que rápidamente adquirirán el tamaño ovulatorio cuando en el anterior se vuelven atrésicos (Bravo *et al*, 1990; Fernández-Baca, 1993; Brown, 2000), explicándose los largos periodos de aceptación de la hembra frente al macho. La receptividad se observa cuando el folículo tiene diámetros ≥ 6 mm (Bravo *et al*, 1989). El crecimiento del folículo dominante (≥ 6 mm) está relacionado con la regresión de los folículos subordinados, estando la inhibina relacionada con la inhibición de los folículos pequeños (Adams *et al*, 1990; Bravo *et al*, 1990). En el caso de que la hembra no reciba el estímulo ovulatorio continuarán desarrollándose ondas foliculares anovulatorias en camélidos sudamericanos (Bravo *et al*, 1990; Adams *et al*, 1990). Es decir, si no ocurre cópula el folículo dominante se atresia y el nuevo folículo dominante puede ser reconocido 2 a 3 días después que se da el descenso de tamaño del folículo dominante presente inicialmente (Bravo *et al*, 1990). Sin embargo, después de la cópula, de la ovulación y de la formación del cuerpo lúteo se produce la emergencia de una nueva onda folicular con presencia de un folículo dominante que no llega a ovular y posteriormente regresionan (Araínga, 2002). En el ovario de las llamas pueden encontrarse en cualquier momento más de un folículo, pero sólo uno desarrolla el mayor tamaño (> 7 mm) y se vuelve dominante (Adams *et al*, 1990; Bravo *et al*, 1990).

En los camélidos las ondas foliculares tienen una duración de 10 a 12 días (Bravo *et al*, 1990). Bravo y Sumar (1989), encontraron que el crecimiento folicular toma en promedio 4 días (3-5 días) para alcanzar el tamaño ovulatorio (8-12 mm) los cuales perduran en promedio 4 días (2-8 días), con folículos que



subsecuentemente sufren atresia durante un periodo de 4 días (3-5 días). El intervalo entre las ondas foliculares no ovulatorios en alpacas es de 15.4 ± 0.5 días (Vaughan, 2001; Vaughan *et al.*, 2004) y en llamas de 18 ± 2.6 días (Chaves *et al.*, 2002) y se sugiere que la extensión de estos intervalos varía en relación con el diámetro del folículo dominante, es decir, un menor intervalo estaría asociado con el menor diámetro del folículo. En llamas, los intervalos entre los sucesivos folículos dominantes que emergen, según Adams *et al.* (1990) son de 19.7 días para llamas vacías y 14.8 días para llamas preñadas, siendo menores en llamas lactantes (Adams *et al.*, 1990); mientras que Bravo *et al.* (1990) reportan en llamas entre 1 a 2 meses posparto un intervalo entre ondas de 11.1 días en promedio.

Tabla 02. CARACTERÍSTICAS DE LAS ONDAS FOLICULARES EN CAMÉLIDOS

| Característica observadas (días) | ALPACA Bravo <i>et al.</i> (2002) | LLAMA Adams <i>et al.</i> (1990) ¹ Chaves <i>et al.</i> (2002) ² | VICUÑA Miragaya <i>et al.</i> (2004) |
|----------------------------------|---|--|---|
| Duración | 12-14 (7 a 19) | 20-25 ¹ 22.6 \pm 2.5 ² | 7.25 \pm 0.46 |
| Fase de crecimiento | 4-5 | 9.2 \pm 2.8 ² | 3.03 \pm 0.18 |
| Fase de estática | 4-5 | 5.2 \pm 1.4 ² | 1.40 \pm 0.21 |
| Fase de regresión | 3-4 | 8.2 \pm 2.2 ² | 2.87 \pm 0.28 |
| Intervalo interonda | - | 20.9 \pm 1.6 ¹ 18.0 \pm 1.0 ² | 4.22 \pm 0.29 |

Fuente: Gigli *et al.* (2006).



2.2.6. Características de los Complejos Ovocito - Cúmulus (COCs)

El ovocito es la célula más grande (80-120 μ diámetro) del mamífero y está rodeada por la zona pelúcida (ZP) y por distintas capas de células de la granulosa formando el complejo ovocito-cúmulus (COCs). Las células de la granulosa inmediatamente adyacentes al ovocito, la corona radiada, tienen largas extensiones citoplasmáticas las que penetran la ZP y terminan en dilataciones bulbosas estrechamente asociadas con la membrana del ovocito (Massip, 2003). La presencia de estos procesos y de las uniones gap desempeñan un papel importante en la cooperación metabólica entre el ovocito y las células del cúmulus durante la fase de crecimiento del mismo (Van Soom *et al.* 2002).

Las células del cúmulus son un complejo metabólico para el ovocito, por las uniones gap heterologas (Shimada *et al.*, 2001) y su papel como modulador del efecto de las hormonas y factores de crecimiento (Shimada *et al.*, 2003), durante la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos, siendo documentada en varias especies (Yamashita *et al.*, 2003).

Los ovocitos completamente rodeados por células del cúmulus presentan mejores índices de fertilización en comparación a los desnudos. También señalan que en los ovocitos desnudos existe un endurecimiento de la zona pelúcida, además de una incompleta maduración citoplasmática, debido a la desconexión existente entre el ovoplasma y estas células (Mochizuki *et al.*, 1991).

En la alpaca, una de las características principales que tienen los ovocitos de camélidos y que se debe a las bajas tasas de maduración, es que



presentan un citoplasma oscuro, esto debido a la presencia de partículas de lípidos, similares a las que presentan los ovocitos de porcinos (Gonzales *et al.*, 2009).

2.2.7 El ovocito inmaduro

En el vacuno, los ovocitos bovinos inmaduros permanecen en profase meiótica I dentro de los folículos ováricos, pero cuando son removidos de éstos y cultivados *in vitro* bajo condiciones adecuadas, reanudan la meiosis espontáneamente y aproximadamente 90% de ellos alcanzan la etapa de metafase II (Mucci *et al.*, 2006). Estos ovocitos inmaduros del folículo antral y en profase (primera fase de la división meiótica), tiene un gran núcleo llamado vesícula germinal (VG). Bajo el efecto de las gonadotropinas la VG se rompe, se forma el plato metafásico y se inicia la segunda fase de la división meiótica o metafase II (MII) caracterizada por la presencia del primer cuerpo polar. Los cambios fundamentales en la estructura y función de los ovocitos ocurren en su desarrollo, desde la VG donde los cromosomas están protegidos en su forma condensada hasta el estadio de MII cuando los cromosomas y el huso acromático están libremente en el citoplasma (Henao y Trujillo, 2003).

Asimismo, informaron que la maduración final del ovoplasma debe ocurrir simultáneamente con la maduración nuclear del ovocito. Del mismo modo, pudo demostrarse que las células del cúmulus que rodean al ovocito inmaduro, cumplen un rol central no solamente en la maduración nuclear sino también en la citoplasmática (Shioya *et al.*, 1988).



2.3. Marco Conceptual

- Ovocito** : Célula germinativa o sexual femenina o producida en los ovarios (Gigli *et al.*, 2006).
- (ovun,huevo)
- Folículo** : El folículo es la unidad estructural y funcional de los ovarios (Gigli *et al.*, 2006).
- Ovogénesis** : La ovogénesis es el proceso de formación y desarrollo del ovocito. Comienza con el desarrollo de las ovogonias que derivan de las células germinales primordiales en el embrión y culmina con la formación del ovocito I (Gigli *et al.*, 2006).
- Foliculogénesis** : La Foliculogénesis se define como el proceso de formación, crecimiento y diferenciación folicular. Abarca desde el estadio del folículo primordial hasta el folículo pre-ovulatorio (Gigli *et al.*, 2006).
- Folículo anovulatorio** : Folículos en ausencia de ovulación (Bravo, 1997).
- Esteroidogénesis** : Formación de esteroides, esencialmente de las hormonas cortico-suprarrenales o genitales (Hafez, 2002).
- Células Gonadotrófas** : Células de la hipófisis anterior que producen la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona



luteinizante (LH) (Brooks y McNelly, 1996).

Fase de crecimiento folicular : Fase en la cual un grupo de folículos son reclutados de la reserva de folículos primordiales, de ellos es seleccionado uno e inicia su crecimiento (Bravo *et al.* 1990; Novoa, 1991).

Fase de maduración folicular : En la fase de estática o de maduración el folículo dominante inhibe el desarrollo de los folículos más pequeños; reportándose una relación inversa entre el diámetro del folículo dominante y el número de folículos pequeños (Bravo *et al.* 1990; Novoa, 1991).

Fase regresión folicular : Es la fase donde el folículo al no alcanzar la fase de crecimiento y maduración se degenera (Bravo *et al.* 1990; Novoa, 1991).

Intervalo interonda : Intervalo de tiempo entre ondas foliculares (Vaughan *et al.*, 2000).

Leptina : Hormona estimulante del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal en vacuno y ovino, al servir como señal para el SN cuando las reservas críticas de grasa sean adecuadas para la secreción de la GnRH (Mantzoros, 2000; Baldelli *et al.*, 2002).



III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.1.1. Características y delimitación de la población

La investigación se delimitó al estudio de los complejos ovocito-cúmulus (COCs) que se encuentran en los folículos de los ovarios de alpaca beneficiadas en matadero.

3.1.2. Ubicación

La investigación se realizó en la Región de Apurímac, provincia de Aymaraes, distrito de Cotaruse, comunidad de Iscahuaca, localizada geográficamente en la puna seca a una altitud entre 3 700 a 5 300 msnm. Para el procesamiento de las muestras estas fueron transportadas al laboratorio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.



3.1.3. Técnicas de muestreo y tamaño de la muestra

Para la investigación se tomó del matadero de la Comunidad de Iscahuaca (Cotaruse, Aymaraes, Apurímac), un total de 184 ovarios (de 92 alpacas) hembras vacías en edad reproductiva, a dos horas post-beneficio, 98 ovarios para el método de aspiración folicular y 86 ovarios para el método de slicing, de los cuales se recuperaron los complejos ovocito-cúmulus (COCs) en diferentes fases de desarrollo.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Materiales de campo

Fichas de colección de muestras.

Lápiz

Cámara fotográfica

Mameluco

Guantes quirúrgicos

Botas

Caja térmica

Termo de 1Lt.

Hervidor eléctrico

Termómetro digital

Antibiótico (Penicilina G potásica).

3.2.2. Materiales de laboratorio

Ovarios de alpaca

Vasos de precipitado de 50 y 20 ml

Placas de Petri de 5ml y 10 ml

Solución fisiológica (NaCl 0.9%)

Jeringas de 10 ml



Agujas hipodérmicas N°21 G X 1 ½ pulgada.
Pipetas Pasteur
Papel toalla
Guantes quirúrgicos
Equipo mínimo de cirugía
Termómetro digital
Mandil
Microscopio (BA210, clinical MOTIC, China group Ltda).

3.3. METODOLOGIA

3.3.1. Método

El método que se utilizó es el método inductivo - deductivo, de nivel aplicativo, de tipo correlacional y explicativo.

3.3.2. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

a. Unidad Experimental

La unidad de experimento fueron los Complejos Ovocitos-Cúmulus (COCs) que se encuentran en los folículos de los ovarios de alpacas recuperados de animales beneficiados en matadero.

b. Procedimiento

Recuperación de ovarios

Se tomaron un total de 184 ovarios (de 92 alpacas) hembras vacías en edad reproductiva, a dos horas post-beneficio, 98 ovarios para el método de aspiración folicular y 86 ovarios para el método de slicing , de los cuales se



recuperaron COCs en diferentes fases de desarrollo de alpacas beneficiadas en matadero de la comunidad de Iscahuaca, distrito de Cotaruse, Aymaraes.

Transporte

Los ovarios fueron transportados inmediatamente a las dos horas post-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 de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

Lavado

Inmediatamente llegado al laboratorio, se procedió a lavar los ovarios por tres veces con solución fisiológica NaCl al 0.9% a 30-35°C y retirar los restos de tejido.

Recuperación

Los ovarios colectados fueron divididos en dos grupos. Para el método de slicing (incisión de la superficie del folículo del ovario), se procedió según Arlotto, *et al.* (1990), para ello se emplearon 86 ovarios (43 alpacas), los cuales se fijaron a una pinza hemostática curva para luego utilizando un bisturí incidir longitudinal y transversalmente todos los folículos visibles de 2 a 6 mm, seguidamente cada ovario fue sumergido por separado en medio de lavado en una placa de Petri graduada y con una suave presión se lavó el folículo. Para el método de aspiración folicular se emplearon 98 ovarios



(49 alpacas), de los que se tomaron solo los folículos visibles de 2 a 6 mm de diámetro, y fueron aspirados utilizando una jeringa de 10 ml con una aguja de 21G x 1½ pulgadas, y luego colocados en solución fisiológica NaCl al 0.9 % de 30-35 °C (Ruiz *et al.*, 2011) entre 5 - 10 ml en una placa de Petri graduada. En todos los casos, se tomaron COCs solo de la superficie visible del ovario.

Decantación

En ambos métodos, después de la colección de los COCs, el contenido de las placas de Petri fue dejado en reposo por aproximadamente 15 min, luego se procedió a decantar cuidadosamente el sobrenadante y se tomó el sedimento colocándolo en una placa de Petri para su posterior observación al microscopio.

Clasificación

La recuperación de COCs, fue individualmente por cada ovario. El contenido de las placas de Petri fue evaluado con la ayuda de un microscopio (BA210, clinical MOTIC, China group Ltda) a 40X. La clasificación se realizó según lo propuesto por De Loose *et al.* (1989), de acuerdo al número de capas de células del cúmulus y la apariencia del citoplasma del ovocito en: Categoría I (COCs con 5 capas compactas de células del cúmulus, y citoplasma homogéneo), Categoría II (COCs con 2 - 4 capas compactas de células del cúmulus, y citoplasma homogéneo), Categoría III (1 capa de células de granulosa o parcialmente denudado, y citoplasma vacuolado; y Categoría IV (ovocitos denudados, y citoplasma granulado).



3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de Chi cuadrado, prueba de comparación de diferencia de proporciones y de medias, utilizando el programa estadístico Statistiscal Automated Sistem SAS_V5.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. MÉTODOS DE RECUPERACIÓN Y CATEGORÍA DE COCs

En cuanto a COCs por categoría (Tabla 01): Los métodos de recuperación como la aspiración folicular y slicing, proveen similar categorización de COCs recuperados ($p>0.05$).

Tabla 03. MÉTODOS DE RECUPERACIÓN (ASPIRACIÓN FOLICULAR Y SLICING) Y CATEGORÍA DE COCs DE ALPACAS POSTMORTEN*

| MÉTODO DE RECUPERACION | CATEGORIA | | | | TOTAL |
|------------------------|-------------|--------------|-------------|------------|------------------|
| | I | II | III | IV | |
| Aspiración folicular | 89 (28.25%) | 110 (34.92%) | 87 (27.67%) | 29 (9.21%) | 315 (100.00%) |
| Slicing | 100(30.86%) | 120 (37.04%) | 74 (22.84%) | 30 (9.26%) | 324 (100.00%) |

*No hay diferencia significativa en los COCs categorizados recuperados por los métodos de aspiración folicular y slicing ($p>0.05$).

Estos resultados difieren a los reportados por Huanca *et al.* (2007), quienes con el método de aspiración folicular hallaron 8.57, 45.71, 40.00 y



5.71% para las categorías I, II, III y IV, respectivamente, habiéndose recuperado diferentes cantidades de COCs por categoría; en este caso el resultado estaría explicado por la recuperación de folículos >3 mm de diámetro de un grupo de 10 ovarios y con aguja de 18 G.

En el vacuno, según Gómez *et al.* (2012) con el método de aspiración folicular encontraron 27.70, 21.13, 27.70 y 23.47% para las categorías A, B, C y D respectivamente, y con el método de slicing encontraron 28.42, 17.89, 27.37 y 26.32% de COCs para las respectivas categorías, habiéndose recuperado diferentes cantidades de COCs por categoría y por método de recuperación de COCs ($p < 0.05$). Estos resultados difieren a los reportados por González *et al.* (1992a) quienes con el método de aspiración folicular hallaron 40.3, 48.3 y 10.9% para las categorías A, B y C respectivamente, y con el método de slicing encontraron 59.3, 33.00 y 7.5% de COCs para las respectivas categorías, recuperando diferentes cantidades de COCs por categoría y por método de recuperación de COCs ($p < 0.05$).

González *et al.* (1992b), al aplicar el método de aspiración folicular, en vacunos se tomó en cuenta los COCs de clase A y B como de calidad cultivable para su maduración *in vitro* obteniéndose un rendimiento de 342 (88.3%) COCs potencialmente cultivables respecto a 42 (10.9%) COCs de clase C no aptos.

Hamano y Kuwayma (1993), hallaron más COCs por el método del slicing que por aspiración folicular (63.3 y 22.1%); y la proporción de COCs de categoría A también fue mayor para el método de slicing (84.6 y 41.3%)



que para el método de aspiración folicular; en ambos casos estaría explicado por la recuperación de COCs de la zona superficial y cortical (folículos < 2 mm de diámetro) del ovario al usar los métodos de slicing y el uso de aguja 18 G para la aspiración folicular.

Según Hernández *et al.* (2010), al comparar la aplicación de los métodos de recuperación de COCs como la aspiración folicular y seccionamiento (slicing), el número de COCs bovinos buenos fue de 95.2 ± 48.92 y 28.8 ± 21.5 y malos fue de 122.6 ± 54.71 ; 70.0 ± 47.86 respectivamente. Estos resultados indican que el método de slicing produce un número mayor de COCs malos por ovario. Se atribuye esta condición como un factor del método de recolección de poblaciones heterogéneas de ovocitos de todos los folículos pequeños en el estroma ovárico y que muchos de estos ovocitos no sean desarrollado.

En otro estudio mediante la aplicación del método de aspiración folicular, de ovarios de vacuno se obtuvo un promedio de recuperación de 26.13% fueron de categoría A, el 21.72% categoría B, el 47.30% categoría C y el 4.85% categoría D (Zarate, 2006).

En la cabra, según Hoque *et al.* (2011), obtuvieron con el método de slicing 1.24 ± 0.07 , 0.67 ± 0.09 , 0.94 ± 0.07 y 1.28 ± 0.13 , para las categorías A, B, C y D, respectivamente y con el método de aspiración folicular encontraron 2.29 ± 0.08 , 0.57 ± 0.08 , 0.63 ± 0.08 y 0.17 ± 0.12 de COCs para las respectivas categorías, habiéndose recuperado diferentes cantidades de COCs por categoría y por método de recuperación de COCs ($p < 0.05$). En este



estudio para el método de slicing las incisiones eran dadas a lo largo de la superficie entera del ovario usando una hoja de bisturí, en el método de aspiración solo se tomaron los folículos vesiculares de 2 a 6 mm con una aguja hipodérmica 18 G.

4.2. MÉTODOS DE RECUPERACIÓN Y CONDICIÓN DE COCs

Al utilizar los métodos de aspiración folicular y slicing de ovarios se recuperó 63.17 y 67.90% de COCs considerados aptos o de condición buenos y 36.83 y 32.10% considerados no aptos o malos para MIV y FIV respectivamente ($p > 0.05$). Solo los COCs de las categorías I y II fueron considerados como aptos o de condición buenos para maduración *in vitro* (Ratto *et al.*, 2005).

Tabla 04. CANTIDAD DE COCs TOTALES BUENOS Y MALOS PARA MADURACIÓN IN VITRO (MIV) Y FERTILIZACIÓN IN VITRO (FIV) DE OVARIOS DE ALPACA*

| METODOS DE RECUPERACION | APTOS (BUENOS) | NO APTOS (MALOS) |
|-------------------------|------------------|------------------|
| Aspiración folicular | 63.17% (199/315) | 36.83% (116/315) |
| Slicing | 67.90% (220/324) | 32.10% (104/324) |

* No existe diferencia estadística entre los COCs aptos (buenos) por la recuperación con los métodos de recuperación ($p > 0.05$).

Al respecto, Huanca *et al.* (2007), reporto la recuperación de 54.00% de COCs considerados aptos (categorías I y II) y 46.00% de COCs considerados no aptos (categorías III y IV), de folículos >3 mm de diámetro de un grupo de 10 ovarios recuperados de matadero postmortem, mediante el



método de aspiración folicular y con aguja de 18 G.

En nuestro caso la recuperación de COCs por el método de aspiración folicular, se aspiraron folículos de 2-6 mm de la superficie del ovario, y con aguja de 21G x 1½ pulgadas. Con el mismo método Ruiz *et al.* (2011), informó que de 667 COCs recuperados de 96 ovarios, el 69% clasificaron como aptos para la maduración in vitro.

Sin embargo, Gonzales *et al.* (2009), de 500 ovarios recuperaron 180 COCs, y de estos solo el 44.4% fueron clasificados como aptos para maduración in vitro y fertilización in vitro; esta baja tasa de recuperación es posible se deba a que se aspiraron folículos de 4 a 6 mm de diámetro y al tiempo de traslado desde lugares alejados hasta el laboratorio de procesamiento. Con respecto al método de slicing de ovarios en la alpaca, la información es escasa, y solo se tiene un reporte desarrollado por (Condori *et al.* 2010).

En el vacuno, Gómez *et al.* (2012), de 200 ovarios recuperaron 46.24% de COCs por el método de slicing y 48.83% ($p > 0.05$) por el método de aspiración folicular, considerados buenos para maduración in vitro y fertilización in vitro; estos resultados es posible que se deban al diseño experimental, en donde la recuperación de COCs fue de folículos de 2-8 mm de diámetro y solo de aquellos encontrados de la superficie del ovario, sin importar el ciclo estral de la vaca.

Similarmente, González *et al.* (1992a), encontraron que del total de COCs recuperados, los COCs de calidad con el método de slicing fue 88.6%



y con aspiración folicular fue 92.3% ($p>0.05$), los autores indican que al usar el método de slicing, incidieron longitudinal y transversalmente el ovario, y no indican la zona (superficial o cortical) de donde fueron tomados los COCs. Takagi *et al.* (1992), utilizando el método de aspiración folicular encontró 43% de COCs de calidad.

Hamano y Kuwayma (1993) reportan que, del total de COCs recuperados, utilizando el método del slicing el 84.6% eran COCs de calidad cultivable, superior a 41.3% de COCs cultivables encontradas con el método de aspiración folicular; aunque usando el slicing tomaron COCs de la superficie y el interior del ovario. Al respecto, Arlotto *et al.* (1996), indica que, los COCs de los folículos corticales son más pequeños, tienen un potencial inferior a la maduración meiótica y desarrollo embrionario, así como solo los ovocitos corticales con diámetros más grandes maduran *in vitro* y desarrollan a blastocitos.

Hernández-Fernández *et al.* (2010), indican que, utilizando los métodos de slicing y aspiración folicular, del total de COCs recuperados en cada técnica, el 63.66 y el 76.77% respectivamente, eran COCs de buena calidad ($p>0.05$).

4.3. MÉTODOS DE RECUPERACIÓN Y RENDIMIENTO DE COCs

Los métodos de aspiración folicular y slicing proveen 3.21 y 3.77 COCs por ovario, 2.03 y 2.56 COCs aptos por ovario respectivamente ($p<0.05$).



Tabla 05. MÉTODOS DE RECUPERACIÓN, NÚMERO DE COCs POR OVARIO, Y NÚMERO COCs APTOS POR OVARIO DE OVARIOS DE ALPACA POSTMORTEN

| MÉTODOS DE RECUPERACION | Nº DE OVOCITOS POR OVARIO | Nº DE OVOCITOS APTOS POR OVARIO |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| Aspiración folicular | 3.21 ± 1.19 ^a | 2.03 ± 0.76 ^a |
| Slicing | 3.77 ± 1.25 ^b | 2.56 ± 0.89 ^b |

Letras diferentes en las columnas significan diferencia estadística ($p < 0.05$).

Similarmente, Ruiz, *et al.* (2011), aspirando folículos (2-6 mm), recolecto en promedio 3.5 complejos ovocito-cúmulus (COCs) por ovario. En comparación con otros métodos, se tiene el reporte de Brogliatti, *et al.* (2000) quien recuperó, sin realizar estimulación ovárica 1.55 COCs por ovario con aspiración folicular guiada en llamas de folículos (>3 mm), y 0.8 COCs de categorías A y B por ovario. Es posible que los ovocitos de alpaca sean más sensibles a la aspiración folicular, ya que esta provocaría daños a nivel de los cúmulus del COCs.

En el vacuno, al aplicar los métodos de recuperación de ovocitos como la aspiración folicular y seccionamiento (Slicing), encontraron 3.8 y 12.8 COCs por ovario; es decir 88.8 y 92.3% COCs de calidad cultivable, respectivamente (Gonzales *et al.*, 1992a). Asimismo con los métodos de slicing y aspiración folicular proveen 5.32 y 4.26 COCs por ovario ($p > 0.05$), así como 2.46 y 2.08 COCs de calidad por ovario ($p > 0.05$), respectivamente (Gómez *et al.*, 2012).



En otro estudio al aplicar del método de aspiración folicular, se obtuvo un promedio de recuperación de 6.11 COCs por ovario, tomando ovocitos de folículos de 2-8 mm de diámetro (Zarate, 2006).

Asimismo Hernández-Fernández *et al.* (2010), con los métodos de slicing y aspiración folicular de folículos de 2 – 8 mm, encontraron 4.3 y 3.2 COCs de buena calidad por ovario ($p > 0.05$), respectivamente. La menor cantidad de COCs de calidad por ovario, es posible se deba a la baja calidad nutritiva de la dieta animal (Ruiz *et al.* 2006); ya que los del bovinos criollos provenían de zonas de pastoreo con pastos naturales que contienen una calidad nutritiva disminuida.

En la cabra, según Hoque *et al.*, (2009), el número total de COCs por ovario obtenidos con los métodos de slicing y aspiración folicular de folículos tomados del estroma y zona cortical del ovario fue de 4.14 y 3.28 respectivamente ($p < 0.05$).



V. CONCLUSIONES

1. **Los procedimientos descritos de los métodos de aspiración folicular y slicing proveen la misma categorización de COCs de ovarios de alpacas postmorten.**
2. **El método de aspiración folicular provee similar proporción de COCs aptos (de condición buenos) que el slicing, al tomar COCs de folículos de 2-6 mm de la superficie del ovario de las alpacas postmorten.**
3. **Sin embargo, el método de slicing provee mayor cantidad de COCs por ovario que la aspiración folicular; así como mayor cantidad de ovocitos aptos por ovario.**



VI. RECOMENDACIONES

1. Es posible utilizar la aspiración folicular o el slicing como métodos de recuperación de COCs, ya que conducen a la misma categorización, siempre que se tomen COCs de folículos de 2-6 mm de la superficie del ovario.
2. Utilizar los métodos de aspiración folicular y slicing con el procedimiento descrito, ya que posibilitan la recuperación de COCs aptos (o de condición buenos), similares.
3. Si se quiere lograr mayor rendimiento de COCs por ovario, tanto en cantidad como de condición buena, se recomienda utilizar el método de slicing.



VII. BIBLIOGRAFIA

- Aba M, Forsberg M, Kindahl H, Sumar J, Edqvist L.** Endocrine changes after mating in pregnant and non-pregnant llamas and alpacas. *Acta Vet Scand.* 1995; 36 (4):489-498.
- Aba M, Bravo P, Forsberg M, Kindahl H.** Endocrine changes during early pregnancy in the Alpaca. *Anim Reprod Sci.* 1997; 47(4):273-279.
- Aba M, Kindahl H, Forsberg M, Quiroga M, Auza N.** Levels of progesterone and changes in prostaglandin F_{2α} release during luteolysis and early pregnancy in llamas and the effect of treatment with flunixin meglumine. *Anim Reprod Sci.* 2000;(59):87-97.
- Ahuja C, Montiel F, Pérez P, Gallegos J.** Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Zootecnia Trop.*, 2009; 27(3): 277-284.
- Alm H, Torner H.** In Vitro maturation of horse oocyte. *Theriogenology.* 1994; (42):345-349.
- Andrade J.** Métodos de sincronización de la onda folicular en base a GnRH y LH y su efecto en la respuesta ovárica y tasa de preñez en alpacas y llamas. [Tesis para Magister]. Lima-Perú. Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Facultad De Medicina Veterinaria; 2007.
- Adams G, Sumar J, Ginther O.** Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *J Reprod Fertil.* 1990; (90): 535- 545.
- Adams G, Sumar J, Ginther O.** Form and function of the corpus luteum in llamas. *Anim Reprod Sci.* 1991;(24):127-138.
- Adams G, Griffin P, Ginther O.** In situ morphologic dynamics of ovaries, uterus and cervix in llamas. *Biology of Reproduction.* 1989; Pág.551-558.
- Adams G.** Comparative Aspects of Follicular Dynamics in Camelids. In: *Rev Inv Vet. Perú.* Suplemento 1.XXIV Reunión Científica APPA.2001. Lima. Pág. 142-146.
- Aparicio M.** Efecto de la frecuencia de copulación en alpacas durante el celo postovulatorio sobre la mortalidad embrionaria. [Tesis Bachillerato] Lima; 2001.
- Arthur G.** Reproducción y obstetricia veterinaria. 1ªed. Editorial Interamericana; 1991.



- Arlotto T, Lebfried-Rutlege ML, First N.** Size distribution and meiotic competence of bovine primary oocyte from two localization in the ovary .*Theriogenology* 1990; (33):188.
- Araínga M, Leyva V, García W, Franco E.** Efecto de la GnRH en el proceso del reconocimiento maternal de la preñez sobre la supervivencia embrionaria en alpacas. *Rev. Inv. Vet. (Perú)*. 2003; 14 (2): 104-110.
- Ball G, Leibfried M, Ax L, First N.** Maturation and fertilization of bovine oocytes in vitro. *J. Dairy Sci.* 1984; 67: 2775-2785.
- Baldelli R, Dieguez C, Casanueva F.** The role of leptin in reproduction: experimental and clinical aspects. *Ann Med.* 2002;34(1):5-18
- Bravo W, Sidkmore J, Zhao X.** Reproductive aspects and storage of semen camelids. *Anim. Reprod. Sci.*2000; 62:173-193.
- Bravo P, Stabenfeldt G, Lasley B, Fowler M.** The effect of ovarian Follicle size on pituitary and ovarian responses to copulation in domesticated South American Camelids. *Biol Reprod.*1991; 45:553-559.
- Bravo P, Pezo D, Alarcón V.** Evaluation of early reproductive performance in the postpartum alpaca by progesterone concentrations. *Anim Repro Sci.*1995a; 39:71-77.
- Bravo P, Lasley B, Fowler M.** Resumption of ovarian follicular activity and uterine involution in the postpartum llama. *Theriogenology.* 1995b; 44:783-791.
- Bravo W, Fowler M, Stabenfeldt G, Lasley B.** Ovarian follicular dynamics in the llama. *Biol. Reprod.* 1990; 43: 579-585.
- Bravo W, Sumar J.** Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. *Anim. Reprod. Sci.* 1989; 30: 271-281.
- Bravo P, Sumar J.** Factores que determinan fertilidad en alpacas. En: V Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Libro de Resúmenes.1985. Cusco, Perú. Pág.4.
- Brogliatti G, Palasz M, Rodriguez A, Mapletoft H, Adams G.** Transvaginal collection and ultrastructure of llama (*Lama &ma*) oocytes.*Thenogenology* 2000; 54:1269-1279.
- Brooks J, McNeilly A.** Regulation of gonadotrophin-releasing hormone receptor expression in the ewe. *Anim Reprod Sci.*1996; 42:89-98.
- Brown B.** A review on reproduction in South American camelids. *Anim Reprod Sci.* 2000; 58: 169-195.



- Calderón N.** Evaluación de la tasa de maduración in vitro de ovocitos bovinos congelados por el método Open Pulled Straw. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Católica de Temuco. 2005. Temuco-Chile.
- Cervantes M.** Estudio del efecto del estadio del desarrollo folicular al momento de la monta sobre la ovulación y sobrevivencia embrionaria en alpacas. [Tesis de médico veterinario]. Lima-Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2004.
- Chaves M, Aba M, Agüero A, Egey J, Berestín V, Rutter B.** Ovarian follicular wave pattern and the effect of exogenous progesterone on follicular activity in non-mated llamas. *Anim Reprod Sci.* 2002; 69(1-2): 37-46.
- De Loose F, Van Vliet P, Van Maurik P, Kruip.** TAM. Morphology of immature oocytes. *Gamete Res* 1989; 24:197-204.
- De Los Ríos E.** Producción textil de fibras de camélidos sudamericanos en el área alto andina de Bolivia, Ecuador y Perú. 2006.
- Escobar P.** Efecto de la eCG en la recuperación de COCs mediante punción folicular guiada por laparoscopia en ovejas. Universidad Austral De Chile Facultad De Ciencias Veterinarias. Instituto de reproducción animal. 2007.
- Fernández-Baca S, Hansel W, Novoa C.** Corpus luteum functions in the alpaca. *Biol Reprod.* 1970; 3:252-261.
- Fernández-Baca S.** La alpaca, reproducción y crianza. Boletín de Divulgación N° 7. IVITA. UNMSM, Lima-Perú. 1971; Pág: 14-38.
- Fernández-Baca S.** Manipulation of reproductive functions in male and female new world camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 1993; 1971; 33:307-323.
- Fernandes R, Hernandez J, Reyes M.** Maduración y fertilización in vitro de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de folículos. *Rev. Salud Animal.* 2010; Pág: 78-83.
- Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K, Toyoda Y.** Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to blastocyst stage. *Biol. Reprod.* 1990; Pág :114-119.
- González R, Soto E, Delgado N, Portillo G, De Ondiz A, Velarde J.** Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos de ovarios de bovino mestizos sacrificados. *Revista Científica FCV de LUZ,* 1992a. Vol II N° 2.



- González R, Soto E, Landaeta A, Velarde J, De Ondiz A, Delgado N.** Recolección y evaluación de oocitos de ovarios de bovinos mestizos sacrificados. *Revista Científica FCV de LUZ*, 1992b. Vol II N° 1.
- Gonzales HM, Cornejo D, Davalos R, Barces O, Melliso E, Ruiz J.** Fecundación *in vitro* de alpaca: Maduración de ovocitos y obtención de embriones (Parte II). *Scientia*, Vol XI, N° 11, 2009; Pág: 183-193.
- Gordon I, Lu K.** Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology*. 1990; 33: 77-87.
- Gigli I, Russo A, Agüero AI.** Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *Sitio argentino de Producción Animal*. 2006; Pág:198-199.
- Gómez O, Alva G, Hillcas E, Salinas D.** Técnicas del Slicing y Aspiración Folicular en la Eficiencia de la Recuperación de Ovocitos Bovinos Criollos Postmorten en el Camal. *Asociación Peruana de Reproducción Animal*. 2012.
- Gore-Langton R, Armstrong D.** Follicular steroidogenesis and its control. En: Knobil & Nelly (eds). *The physiology of reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press. 1994; Pág: 571-628.
- Hamano S, Kuwayama M.** *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*. 1993; 39(3):703-712.
- Hafez E.** *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 6ta ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill. México. 1996; Pág: 525.
- Hafez E.** *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 7ma ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill. México. 2002; Pág: 519.
- Henaó G, Trujillo L.** Dinámica folicular y función lútea durante la gestación temprana. Estudio de un caso en *bos indicus* *Rev.Fac.Nal.Agr. Medellín*. 2003; Vol.56, No.1. Pág.1779-1788.
- Hoque S, Sanjoy M, Yahia K, Anupom M, Tareq A.** Effect of collection techniques on cumulus oocyte complexes (COCs) recovery, *in vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. Full Length Research Paper. *African Journal of Biotechnology* 2011; Vol. 10(45), Pág. 9177-9181, 17.
- Huanca W, Palomino JM, Cervantes M, Cordero A, Huanca T.** Efecto de temperatura de transporte (35°C, 4°C) sobre la calidad morfológica de



- ovocitos colectados desde ovarios de alpacas. APPA – ALPA. 2007. Cusco, Perú.
- Huanca T.** Efecto de la Administración de Gonadotropinas Exógenas (FSH y eCG en la Respuesta Ovárica y la Producción de Embriones en Alpacas (*Vicugna Pacos*). [Tesis Doctoral].Puno-Perú.Universidad de Santiago de Compostela, Departamento de Patología Animal Facultad de Veterinaria de Lugo; 2008.
- INEL.** Instituto Nacional de Estadística e Informática; IV Censo Nacional Agropecuario 2012.
- Kinder J, Day M, Kittok R.** Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. *J Reprod Fertil Suppl.* 1987; 34:167-86.
- Konishi M, Aoyagi Y, Takedomi T, Itakura H, Itoh T, Yazawa S.** Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved in vitro development of ivm-ivf bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. *Theriogenology.* 1996; 45 573-561.
- Leibfried L, First N.** Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J. Reprod. Fert.* 1979;Vol. 48, Pág.76-86.
- Lu K.** Studies related to the *in vitro* maturation and fertilization of ovarian oocytes in cattle. Ph.D. [Thesis, National University of Ireland, Dublin. Citado por Gordon I.]1994.
- Leyva V, García W.** Efecto de la Progesterona exógena sobre la función del cuerpo lúteo de alpacas. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Resumen. 1999a. Pág. 87.Cusco, Perú.
- Leyva V, García W.** Efecto de la Prostaglandina sobre la vida del cuerpo lúteo en alpacas. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Resumen. 1999b.Cusco. Pág. 88.
- Mantzoros C.** Role of leptin in reproduction. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;900:174-183.
- Massip A.** Cryopreservation of bovine oocytes: Current status and recent developments. *Reprod Nutr Dev.*2003;43:325.
- Murdoch W.** Programmed cell death in preovulatory ovine follicles. *Biol Reprod.* 1995; 53(1):8-12.
- Mochizuki H, Fukui Y, Ono H.** Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization and development of bovine oocytes. *Theriogenology.* 1991;Vol. 36, Pag. 973-986.



- Mucci N, Aller J, Kaiser G, Hozbor F, Alberio R.** Producción in vitro de embriones bovinos: Suplementación de los medios de cultivo con suero. Arch. Med. Vet.2006; 38(2): 97-104.
- Novoa C.** Reproducción de Camélidos. Rev. Cien. Vet. 1992; Vol.8, Nº 4. Lima, Perú.
- Novoa C.** Fisiología de la reproducción de hembra .En avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos.Cap.III. Editor Fernández Baca S. Santiago de Chile;1991.
- Novoa C.** Reproducción. In: Simposio de producción de alpacas y llamas. XII Reunión Científica Anual. APPA. 1989; Perú. Pag. 67-72.
- Novoa C, Fernández Baca S, Sumar J, Leyva V.** Pubertad en la alpaca. Rev. Inv. Pec. (IVITA). 1972; 1(1): 29-35.
- PROREAL.** Proyecto Alpaquero Regional de Apurímac. Gobierno Regional de Apurímac, 2009.
- Pollard J, Littlejohn R, More G.** Seasonal and other factors affecting the sexual behaviour of alpacas. Anim. Reprd. Sci. 1995; 37:349-356.
- Ruiz J, Landeo L, Artica M, Ratto M, Correa J.** Activación química de ovocitos de alpaca vitrificados después de la maduración *in vitro*. Rev Inv Vet Perú 2011; 22(3):206-212.
- Ruiz A, Domínguez N, Martínez L, Pinto K, Drescher M, Rossini R, Pérez Rojas R, Araneda A, Fernández N, et al.** Efecto del nivel de alimentación sobre la actividad ovárica, expresión de transporte de glucosa y tolerancia a la insulina en vacas mestizas durante el posparto. Zootecnia Tropical, 2008; Vol. 26, No. 2.
- Ratto M, Berland, Huanca W, Singh J, Adams G.** In vitro and in vivmaturation of llama oocytes. Theriogenology. 2005; 63: 2445-2457.
- Ríos M, Sumar J, Alarcón V.** Presencia de un factor de inducción de la ovulación en el semen de alpaca y toro. Resumen VIII Reunión Científica Anual Asociación Peruana Producción Animal.1985; Perú.Huancayo.C-27.
- Rodríguez R.** Ovulación en las alpacas. [Tesis de Medico Veterinario]. UNMSM. Lima, Perú; 1959.
- Sato A, Montoya L.** Aparato reproductor de la alpaca (*Lama pacos*), Anatomía macroscópica. Rev. Camélidos sudamericanos. 1990; Pág:7-13.



- San Martín M, Copaira M, Zúñiga J, Rodríguez R, Bustinza G, Acosta L.** Aspects of reproduction in the alpaca. *J Reprod Fertil.* 1968;16:395-399.
- Shimada M, Ito J, Yamashita Y, Okazaki T, Isobe N.** Phosphatidylinositol 3-kinase in cumulus cells is responsible for both suppression of spontaneous maturation and induction of gonadotropin-stimulated maturation of porcine oocytes, *J. Endocrinol.* 2003; 179 (1): 25-34.
- Shimada M, Maeda T, Terada T.** Dynamic changes of connexin-43, gap junctional protein, in outer layers of cumulus cells are regulated by PKC and PI 3-kinase during meiotic resumption in porcine oocytes, *Biol. Reprod.* 2001; 64 (4):1255-1263.
- Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S, Hanada A.** In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. *Theriogenology.* 1988; (30) Pág: 489-496.
- Schillo K.** Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J Anim Sci.* 1992; 70:1271.
- Solis S.** Producción de camélidos sudamericanos., 1ra. Ed. Huancayo - Perú. 1997.
- Sumar J, Alarcón V.** Estímulo coital y fertilidad en alpacas. En: Resumen XII Reunión Cient Anu Asoc Peruana Prod. Anim. 1989. Perú. Lima. Pág.67.
- Sumar J.** Llamas and Alpacas. In: *Reproduction in farm animals.* Edit by Hafez, 2000 Pág. ESE. 7th edition. USA Pág. 218-228.
- Sumar J.** Studies on reproductive pathology in alpacas. MS Thesis, Department of Obstetrics and Gynaecology, College of Veterinary Medicine, Swedish University of Agriculture and Science, Uppsala. 1989; Pág: 9-1003.
- Sumar J.** Reproduction in llamas and alpacas *Animal Reproduction Science* .1996; 42: 405-415, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Estación Principal de Aha de La Raya, Cusco. Perú.
- Sumar J.** Llamas and Alpacas. In: *Reproduction in farm animals.* Edit by Hafez, ESE. 2000. 7th edition. USA Pág. 218-228.
- Stevenson Y.** Clinical reproductive physiology of the cow. In: *Current Therapy in large animal.* *Theriogenology I* 1997; Pág: 257-267.
- Takahashi Y, First N.** In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, private, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 1992; 37: 963-978.



- Takagi Y, Mori K, Takahashi T, Sugawara S, Masaki J.** Differences in development of bovine oocytes recovered by aspiration or by mincing. *J. Anim. Sci.* 1992; 70:1923-1927.
- Vaughan J.** Ovarian function in South American camelids (alpacas, llamas, vicuñas, guanacos) A content lists available at Science Direct Animal Reproduction Science journal homepage: 2010.
- Vaughan J, Tibary A.** Reproduction in female South American camelids: A review and clinical observations. *Small Ruminant Research.* 2006; 61: 259-281.
- Vaughan J, Macmillan K, D'Occhio M.** Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Anim. Reprod. Sci.* 2004; 80: 353–361.
- Vaughan J.** Control of follicular waves in alpacas. *Rev. Inv. Vet. (Perú).* Suplemento 2001; 1: 112-114.
- Vaughan J, Occhio M, Macmillan K.** Ovarian follicular inter-wave intervals in Alpacas. In: 14th International Congress on Animal Reproduction. 2000; 1:59.
- Van S, Tanghe S, De Pauw I, Maes D, De Kruif A.** Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reprod. Dom. Anim.* 2002; 37:114.
- Vivanco W, Cárdenas H, Bindon B.** Relación entre la duración de la cópula y momento de ovulación en alpacas. En: Resum XII Reunión Cient Anu Asoc Peruana Prod. Anim. 1985; Perú. Lima. p19.
- Xu K, Hoier R, Greve T.** Dynamic changes of estradiol and progesterone concentrations during in vitro maturation in cattle. *Theriogenology.* 1988; Vol. 30, Pág. 245-255.
- Yamashita Y, Shimada M, Okazaki T, Maeda T, Terada T.** Production of progesterone from de novo-synthesized cholesterol in cumulus cells and its physiological role during meiotic resumption of porcine oocytes, *Biol. Reprod.* 2003; 68 (4):1193-1198.
- Zarate O.** Comparación de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovinos. [Tesis de Maestro]. Universidad Veracruzana. México; 2006.
- Zúñiga J.** El celo en las alpacas. [Tesis de Bachiller en Medicina Veterinaria]. UNMSM. Lima, Perú; 1958.

ANEXOS

ANEXO 01

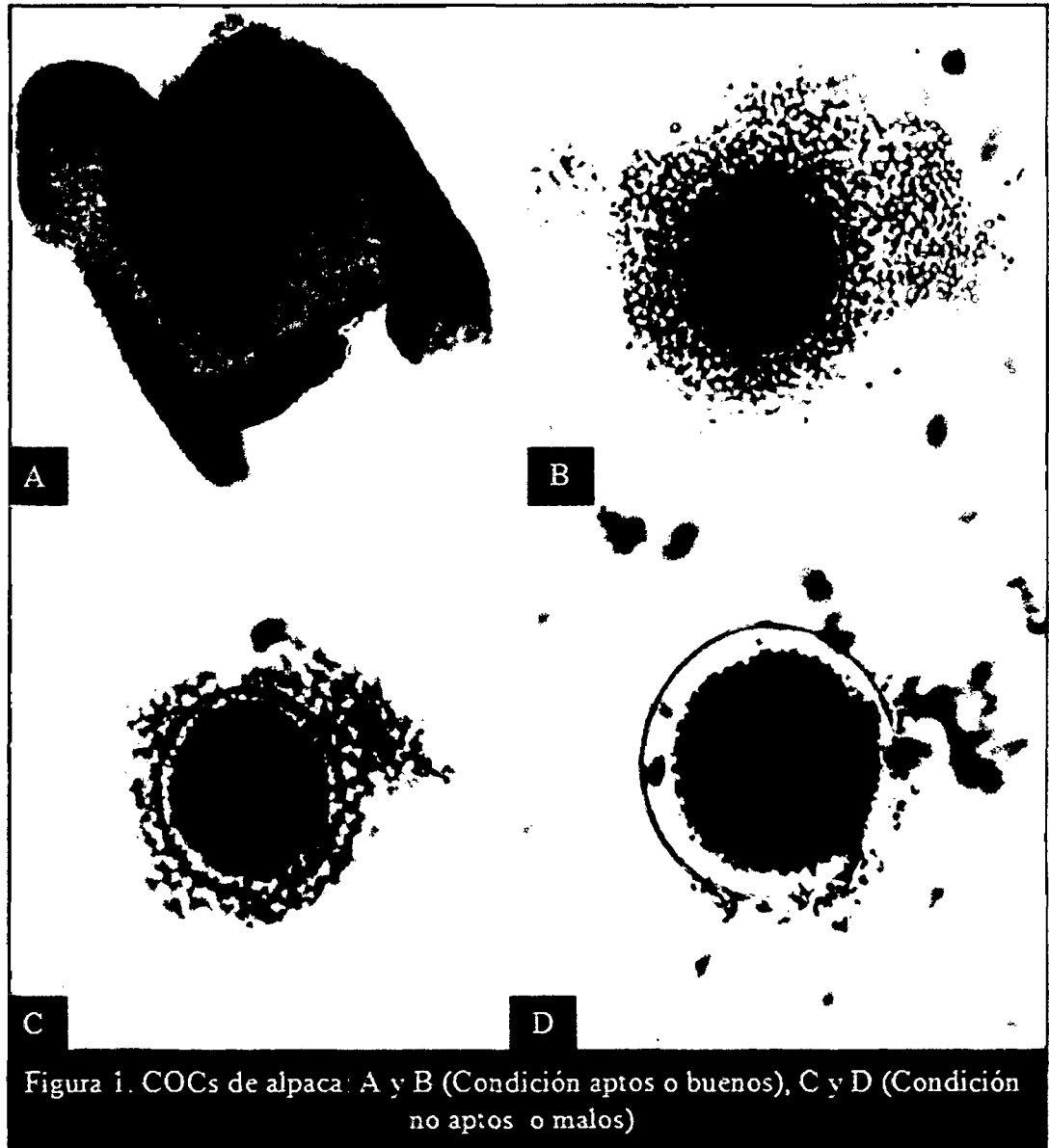
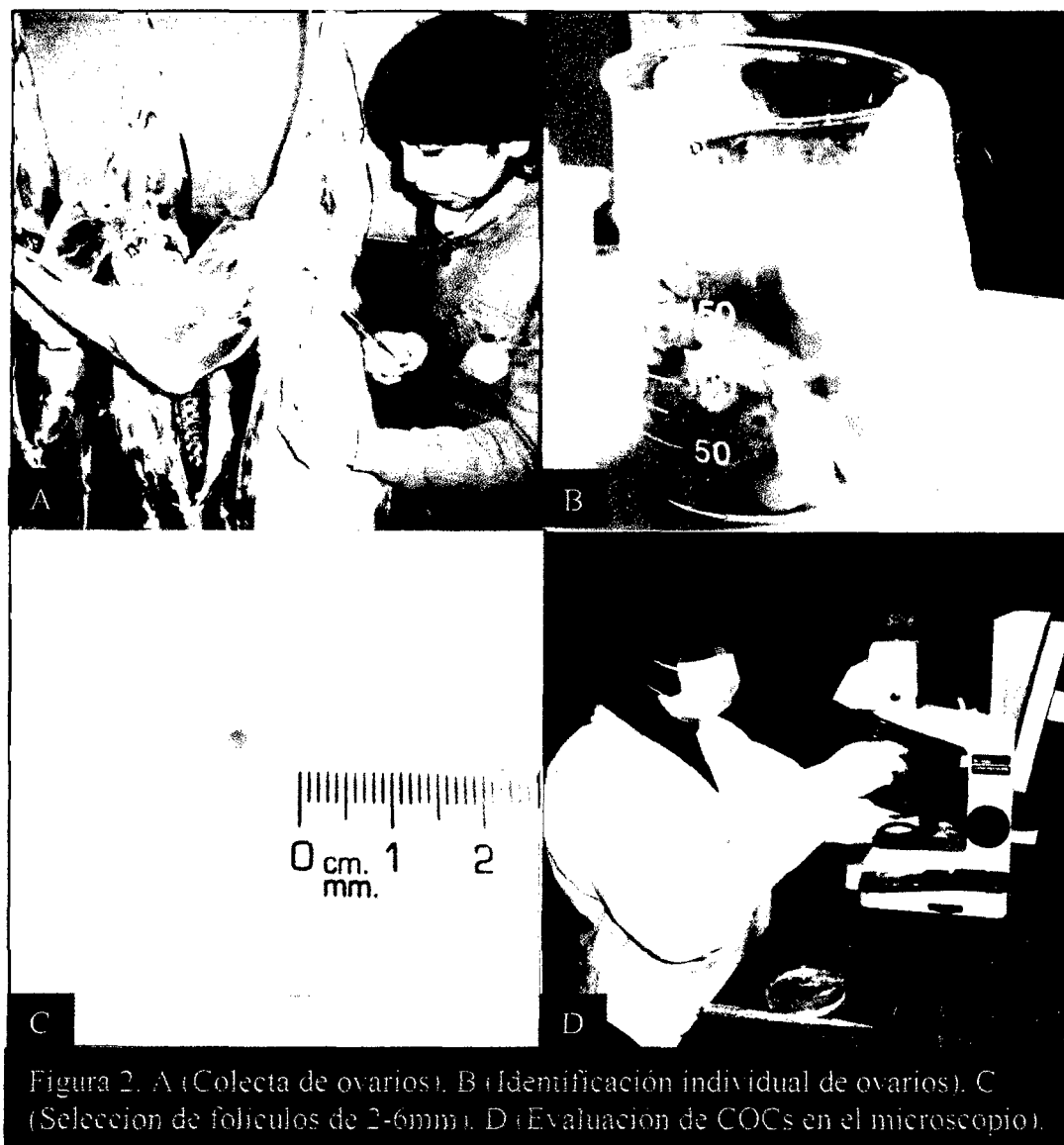


Figura 1. COCs de alpaca: A y B (Condición aptos o buenos), C y D (Condición no aptos o malos)



ANEXO 02



ANEXO 03

PRUEBA DE CHI CUADRADO PARA DEPENDENCIA ENTRE CATEGORIZACION DE COCs Y MÉTODOS DE RECUPERACIÓN (SLICING Y ASPIRACIÓN FOLICULAR)

| Estadístico | GL | Valor | Probabilidad |
|--|----|--------|--------------|
| Chi-cuadrado | 3 | 2.0153 | 0.5692 |
| Ratio Chi-cuadrado de la verosimilitud | 3 | 2.0165 | 0.5690 |

Tamaño de la muestra = 639



ANEXO 04

PRUEBA DE CHI CUADRADO PARA DEPENDENCIA ENTRE MÉTODOS DE RECUPERACIÓN Y CONDICIÓN DE COCs

| Estadístico | GL | Valor | Probabilidad |
|--|----|--------|--------------|
| Chi-cuadrado | 1 | 1.5806 | 0.2087 |
| Ratio Chi-cuadrado de la verosimilitud | 1 | 1.5811 | 0.2086 |

Tamaño de la muestra = 63



ANEXO 05

PRUEBA DE COMPARACIÓN DE DIFERENCIA DE PROPORCIONES DE COCs POR OVARIO Y COCs APTOS POR OVARIO SEGÚN MÉTODOS DE RECUPERACIÓN

| MÉTODOS | COCs POR OVARIO | | | COCs APTOS POR OVARIO | | | |
|----------------------|-----------------|-----|------------|-----------------------|-----|------------|---------|
| | Muestra | N | Proporción | Valor p | N | Proporción | Valor p |
| Slicing | P1 | 315 | 3.21 | 0.000 | 199 | 2.03 | 0.000 |
| Aspiración folicular | P2 | 324 | 3.77 | | 220 | 2.56 | |



ANEXO 06

FORMATO UTILIZADO PARA LA COLECCIÓN DE OVARIOS DE ALPACA BENEFICIADAS EN EL MATADERO DE LA COMUNIDAD DE ISCAHUACA.

| Nº DE ANIMAL | EDAD | CONDICIÓN CORPORAL | ESTADO | CL | OD | OI |
|--------------|------|--------------------|--------|----|----|----|
| 1 | | | | | | |
| 2 | | | | | | |
| 3 | | | | | | |
| 4 | | | | | | |
| 5 | | | | | | |
| 6 | | | | | | |
| 7 | | | | | | |
| 8 | | | | | | |
| 9 | | | | | | |
| 10 | | | | | | |
| 11 | | | | | | |
| 12 | | | | | | |

Leyenda: CL: Cuerpo lúteo, OD: Ovario derecho, OI: Ovario izquierdo.

