

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

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Tesis

Dos concentraciones de hormona folículo estimulante en medio de maduración *in vitro* de ovocitos sobre la tasa de blastocistos en *Vicugna pacos*

Presentado por:

Isabel Saenz Blas

Para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista

Abancay, Perú

2024



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



TESIS

Dos concentraciones de hormona foliculo estimulante en medio de maduración *in vitro* de ovocitos sobre la tasa de blastocistos en *Vicugna pacos*

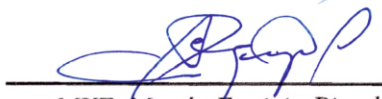
Presentada por **Isabel Saenz Blas**, para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista

Sustentado y aprobado el 15 de agosto de 2024 ante el jurado evaluador:

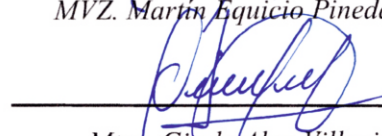
Presidente:


Mtro. Max Henry Escobedo Enríquez

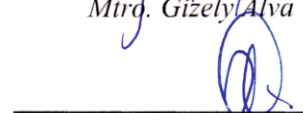
Primer miembro:


MVZ. Martín Equicio Pineda Serruto

Segundo miembro:


Mtro. Gizely Alva Villavicencio

Asesor:


Dr. Ulises Sandro Quispe Gutiérrez



Constancia de similitud Informe de tesis Constancia 12(2)-2024-DIU-FMVZ-UNAMBA

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

Hace constar:

Que, **Isabel Saenz Blas**, con código de estudiante **171201** de la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, presentó el informe de tesis:

Dos concentraciones de hormona folículo estimulante en medio de maduración *in vitro* de ovocitos sobre la tasa de blastocistos en *Vicugna pacos*

Para ser evaluada su similitud.

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

Porcentaje de similitud: 16%

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

Esta constancia es la segunda versión de la anterior similitud, se expide para fines de trámites en la UNAMBA.

Abancay, 7 de noviembre de 2024

Atentamente,

Dr. Ulises S. Quispe Gutiérrez
Director
investigacion.fmvz@unamba.edu.pe

cc/.
Arch.

Agradecimiento

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional y confianza en todos mis proyectos.

Al Dr. Ulises Sandro Quispe Gutiérrez y al Dr. Jaime Antonio Ruiz Béjar, mis asesores de tesis, quienes me apoyaron durante este trabajo con su conocimiento, experiencia, tiempo y paciencia.

A la Ing. Lisbeth Nataly Manriquez Espinoza, por su tiempo, su conocimiento y paciencia.



Dedicatoria

A mis padres, Fortunata Blas Cahuana y Federico Saenz Quispe, por creer y confiar en mí, día a día. Por estar siempre dispuestos a acompañarme, en todos los proyectos.

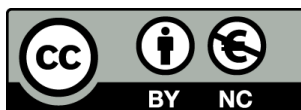
A mis hermanos Hector Federico Saenz Blas, Gladys Saenz Blas y Juana Luisa Saenz Blas por su cariño, apoyo y por siempre motivarme a ser mejor cada día.



Dos concentraciones de hormona folículo estimulante en medio de maduración *in vitro* de ovocitos sobre la tasa de blastocistos en *Vicugna pacos*

Línea de investigación: Ciencias Veterinarias

Esta publicación está bajo una Licencia Creative Commons



ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
CAPÍTULO I	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
1.1 Descripción del problema	5
1.2 Enunciado del problema	6
1.2.1 Problema general	6
1.2.2 Problemas específicos	6
1.2.3 Justificación de la investigación	6
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	8
2.1 Objetivos de la investigación	8
2.1.1 Objetivo general	8
2.1.2 Objetivos específicos	8
2.2 Hipótesis de la investigación	8
2.2.1 Hipótesis general	8
2.2.2 Hipótesis específicas	8
2.3 Operacionalización de variables	9
CAPÍTULO III	10
MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	10
3.1 Antecedentes	10
3.2 Marco teórico	11
3.2.1 Generalidades de la alpaca	11
3.2.2 Producción de embriones <i>in vitro</i>	12
3.2.2.1 Maduración <i>in vitro</i>	12
3.2.2.2 Fecundación <i>in vitro</i>	12
3.2.2.3 Cultivo de embriones <i>in vitro</i>	12
3.2.3 Medios de cultivo	13
3.2.3.1 Medio básico de maduración TCM-199	13
3.2.3.2 Macromoléculas	13
3.2.3.3 Antibióticos	14
3.2.3.4 Aminoácidos	14
3.2.3.5 Hormonas	14
	1



3.2.4	Hormonas gonadotrópicas	15
3.2.4.1	Hormona folículo estimulante	15
3.2.4.2	Hormona luteinizante	16
3.2.5	Composición estructural de las gonadotropinas	16
3.2.6	Desarrollo de embriones	17
3.2.6.1	Segmentación o división embrionaria	17
3.2.6.2	Mórula	17
3.2.6.3	Blastocisto temprano	17
3.2.6.4	Blastocisto expandido	18
3.2.6.5	Blastocisto protruido	18
3.2.7	Evaluación embrionaria	18
3.2.7.1	Evaluación morfológica	18
3.2.7.2	Grado de expansión de blastocele	18
3.2.7.3	La estructura de las células del trofoectodermo	19
3.2.7.4	Clasificación de la calidad embrionaria	19
3.3	Marco conceptual	20
CAPÍTULO IV		22
METODOLOGÍA		22
4.1	Tipo y nivel de investigación	22
4.2	Diseño de la investigación	22
4.3	Población y muestra	22
4.4	Procedimiento	23
4.5	Técnica e instrumentos	23
4.5.1	Colección de ovarios y recuperación de ovocitos	23
4.5.2	Evaluación de ovocitos	23
4.5.3	Maduración <i>in vitro</i>	23
4.5.4	Fertilización <i>in vitro</i>	24
4.5.5	Cultivo <i>in vitro</i> de embriones	24
4.6	Análisis estadístico	25
CAPÍTULO V		26
RESULTADOS Y DISCUSIONES		26
5.1	Análisis de resultados	26
5.2	Contrastación de hipótesis	27
5.3	Discusión	27
CAPÍTULO VI		29
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		29
6.1	Conclusiones	29



6.2	Recomendaciones	29
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
	ANEXO	37

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Operacionalización de variables.	9
Tabla 2. Distribución de tratamiento de hormona folículo estimulante.	22
Tabla 3. Porcentaje de blastocisto cultivados in vitro en alpacas.	26

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Ovarios en medio de lavado	38
Fig. 2. Ovario colectado del matadero	38
Fig. 3. Lavado de ovocitos, observado en estereomicroscopio	39
Fig. 4. Selección de ovocitos, observado bajo el estereomicroscopio	39
Fig. 5. Preparación de los medios de cultivo	40
Fig. 6. Desarrollo embrionario, observado en el día 7	40

INTRODUCCIÓN

La alpaca, es un camélido sudamericano, apreciado por las comunidades altoandinas del Perú, muchas familias dependen de la producción de la carne y fibra de alta calidad que les proporciona esta especie ¹. La reproducción se lleva a cabo principalmente a través de la monta natural, donde el apareamiento ocurre de manera instintiva ². De este apareamiento alrededor del 20% no preñan, alargándose el intervalo entre partos y en consecuencia se obtiene pocas crías ³; 4 o 5 crías en su vida productiva ⁴. A estas limitaciones se suma la crianza tradicional sin mayor manejo reproductivo donde alpacas machos y hembras permanecen juntos todo el año ^{5,6}.

Se adoptaron técnicas de reproducción asistida para acelerar el proceso de mejoramiento genético, seleccionando características deseables y aumentar la productividad de la alpaca ^{1,2,7}. Entre ellos se ha adoptado programas de producción *in vitro* de embriones las cuales constan de tres etapas esenciales: maduración del ovocito *in vitro*, fertilización del ovocito *in vitro* y cultivo *in vitro* de embriones ⁸. En los camélidos sudamericanos los estudios sobre la biotecnología reproductiva están en etapas iniciales en comparación con otras especies ⁹, por lo que, aun enfrentan desafíos técnicos y biológicos ¹⁰.

La suplementación de los medios de maduración con gonadotropinas asegura la capacidad de producir buenas tasas de maduración, fertilización y divisiones tempranas. Aquellos que son madurados en ausencia de gonadotropinas presentan bajas tasas de desarrollo embrionario, esto debido a la ausencia del estímulo hormonal, que es fundamental para la reanudación de la meiosis. Por tanto, la hormona foliculoestimulante (FSH), muestra efecto positivo sobre la maduración *in vitro*, la fertilización y el desarrollo embrionario en bovinos ¹¹. Este efecto posiblemente es porque la FSH participa en la maduración *in vitro* a nivel de las células del cúmulo, provocando la síntesis de ácido hialurónico y la expansión de estas células, lo que ayuda la capacitación de los espermatozoides, lo que mejora la fertilización y el desarrollo embrionario ¹². Además, las concentraciones de FSH específicas en la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca, aún no están determinadas ¹³; en consecuencia, es importante realizar estudios referidos a probar diferentes concentraciones de FSH en procesos de producción de embriones *in vitro* en alpacas.



El presente estudio, trata sobre el uso de dos concentraciones de la hormona folículo estimulante, suplementada en medio de maduración *in vitro* de ovocitos, y su efecto en el cultivo *in vitro* de embriones expresada como tasa de blastocistos de alpacas a 7 días.



RESUMEN

La aplicación de la biotecnología reproductiva en alpacas es poca estudiada, aún más la producción de embriones *in vitro*. El objetivo de este estudio fue evaluar dos concentraciones de hormona folículo estimulante (FSH) suplementadas en medio de maduración *in vitro* de ovocitos sobre la tasa de blastocisto en alpacas. Los ovarios fueron colectados de alpacas sacrificadas en el matadero. Los ovocitos fueron recuperados de folículos ováricos y clasificados en tres categorías, los de categoría A y B fueron cultivados. Los ovocitos se agruparon en dos tratamientos (T), T1: 0.05 UI/mL; T2: 0.10 UI/mL de FSH los que fueron suplementados al medio de maduración *in vitro*, luego fertilizados y cultivados *in vitro* como presuntos cigotos, pasado 7 días, los embriones fueron evaluados mediante observación de la morfología utilizando estereomicroscopio. El resultado de la tasa de blastocisto fue similar ($P > 0.05$) entre T1 (22.32%) y T2 (24.23%). En conclusión, se puede utilizar 0.05 o 0.10 UI/mL de FSH y lograr una tasa de blastocisto alrededor del 20% en cultivo *in vitro* de embriones de alpaca.

Palabras clave: *blastocisto, FSH, maduración, embrión.*



ABSTRACT

The application of reproductive biotechnology in alpacas is little studied, even more so the production of *in vitro* embryos. The objective of this study was to evaluate two concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH) supplemented in *in vitro* oocyte maturation medium on the blastocyst rate in alpacas. The ovaries were collected from alpacas slaughtered at the slaughterhouse. The oocytes were recovered from ovarian follicles and classified into three categories, those of category A and B were cultured. The oocytes were grouped into two treatments (T), T1: 0.05 IU/mL; T2: 0.10 IU/mL of FSH, which were supplemented to the *in vitro* maturation medium, then fertilized and cultured *in vitro* as presumptive zygotes. After 7 days, the embryos were evaluated by observing the morphology using a stereomicroscope. The result of blastocyst rate was similar ($P > 0.05$) between T1 (22.32%) and T2 (24.23%). In conclusion, you can use 0.05 or 0.10 IU/mL of FSH and achieve a blastocyst rate of around 20% *in vitro* culture of alpaca embryos.

Keywords: *blastocysts, FSH, maturation, embryo.*



CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción del problema

La alpaca es una especie económicamente importante para las comunidades altoandinas, enfrenta varios problemas reproductivos¹. Aunque existen muchas tecnologías de reproducción asistida, son poco empleadas en camélidos, ya sea por falta de conocimiento o porque la biotecnología reproductiva todavía no está bien desarrollada a diferencia de otras especies como los ovinos y bovinos⁹. Por otro lado, la reproducción de las alpacas se lleva principalmente a través de monta natural, donde el apareamiento ocurre de manera instintiva². De este apareamiento alrededor del 20% no preñan, alargándose el intervalo entre partos y en consecuencia se obtiene pocas crías³; 4 o 5 crías en su vida productiva⁴. Además, los productores alpaqueros utilizan sistemas de producción tradicionales, lo que dificulta la selección de las características deseadas para mejorar la productividad^{5,6}.

La producción *in vitro* de embriones en alpacas se encuentra en etapas iniciales, los medios de maduración *in vitro* no están estandarizadas como ocurre para las otras especies animales. La suplementación de las gonadotropinas en medio de maduración sigue siendo un tema de investigación⁷, lo que refleja en el bajo recuento de blastocistos en camélidos⁸. En otras especies la FSH se utiliza para mejorar los procesos de producción de embriones *in vitro*¹⁴. Sin embargo, su uso en alpacas no ha sido estudiado suficientemente.

La falta de conocimiento básico sobre el uso de la FSH y sus concentraciones en maduración *in vitro*, limita la capacidad de mejorar la producción de embriones *in vitro*. Todavía no están claros los protocolos de producción embriones, por esa razón, aún no hay alpacas nacidas bajo esta tecnología. Estas limitaciones, afectan el mejoramiento genético de las alpacas, porque esta herramienta de producción de embriones *in vitro* para el progreso genético rápido no está bien desarrollada. En consecuencia, los mejores animales no se pueden usar masivamente para reproducción animal, aspecto que limita

usar los mejores reproductores para producir mejor fibra y carne de camélidos. De esta forma, los productores camélidocultores son desfavorecidos.

1.2 Enunciado del problema

1.2.1 Problema general

¿Cuál es el efecto de dos concentraciones de hormona folículo estimulante, suplementadas en el medio de maduración *in vitro* de ovocitos, sobre tasa de blastocisto en alpacas?

1.2.2 Problemas específicos

- ¿Cuál es el efecto de la suplementación de 0.05 UI/mL de la hormona folículo estimulante en el medio maduración *in vitro* de ovocitos, sobre tasa de blastocisto en alpacas?
- ¿Cuál es el efecto de la suplementación de 0.10 UI/mL de la hormona folículo estimulante en el medio maduración *in vitro* de ovocitos, sobre tasa de blastocisto en alpacas?

1.2.3 Justificación de la investigación

La importancia del uso de la tecnología de la producción de embriones *in vitro*, a pesar de sus limitaciones, orienta al uso de los mejores animales de alto valor genético para la producción alpaquera, de tal forma se obtenga mayor calidad de fibra y carne en favor de los camelidocultores, esta producción ayudaría a mejorar la economía familiar y comunal rural. La adopción de reproducción asistida puede mejorar la reproducción y acelerar el mejoramiento genético seleccionando las características genéticas deseables y aumentar la productividad de las alpacas ^{1,2}.

Acortar los tiempos generacionales de las alpacas, ayuda a obtener mayor cantidad de crías por vida reproductiva de los animales, esta posibilidad ofrece la tecnología de la producción de embriones *in vitro*. Está evidenciado que los medios de cultivo en la maduración *in vitro*, fertilización *in vitro* y cultivo de embriones *in vitro*, afectan las tasas de cada una de ellas. En efecto, mejorar la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca utilizando diferentes concentraciones de FSH, coadyuvaría los conocimientos básicos para mejorar la tasa y calidad de los blastocistos de las alpacas. Por lo que, es importante lograr



la composición y condiciones adecuadas de cultivo que permitan la expresión completa del desarrollo embrionario y mejorar las tasas de blastocisto ^{8,15} .

Las gonadotropinas desempeñan un papel fundamental en el crecimiento folicular y maduración meiótica de los ovocitos ⁷. El efecto de las gonadotropinas en un entorno de cultivo *in vitro* y la importancia de encontrar una concentración equilibrada en el medio de cultivo sigue siendo tema de estudio⁷. En alpacas, la FSH se utilizó sola o en combinación con otras gonadotropinas en diferentes concentraciones, teniendo resultados variables ^{16,17}. Por las consideraciones anteriores, hay necesidad de investigar la suplementación de varias concentraciones de FSH en la maduración de ovocitos *in vitro* y sus efectos en la tasa de blastocistos de alpaca.



CAPÍTULO II

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivos de la investigación

2.1.1 Objetivo general

Evaluar los efectos de dos concentraciones de la hormona folículo estimulante, suplementadas en medio de maduración *in vitro* de ovocitos, sobre la tasa de blastocisto en alpacas.

2.1.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la suplementación de 0.05 UI/mL de la hormona folículo estimulante, en medio de maduración de ovocitos, sobre la tasa de blastocisto de alpaca cultivados *in vitro*.
- Observar el efecto de la suplementación de 0.10 UI/mL de la hormona folículo estimulante, en medio de maduración de ovocitos, sobre la tasa de blastocisto de alpaca cultivados *in vitro*.

2.2 Hipótesis de la investigación

2.2.1 Hipótesis general

El efecto de la concentración de 0.05 UI/mL de hormona folículo estimulante es similar a la concentración de 0.10 UI/mL, cuando se suplementa en medio de maduración *in vitro* de ovocitos, sobre la tasa de blastocisto en alpacas.

2.2.2 Hipótesis específicas

- Con la suplementación de 0.05 UI/mL de hormona folículo estimulante, en el medio de maduración *in vitro* de ovocitos, se obtiene 15% de tasa de blastocisto en alpacas.
- Con la suplementación de 0.10 UI/mL de hormona folículo estimulante, en el medio de maduración *in vitro* de ovocitos, se alcanza 20% de tasa de blastocisto en alpacas.

2.3 Operacionalización de variables

Tabla 1

Operacionalización de variables.

Variables	Indicador
Independiente	
Concentración de FSH	Concentraciones de 0.05 y 0.10 UI/mL de la FSH.
Dependiente	
Tasa de blastocisto	Número de blastocistos observados en el día 7 de cultivo <i>in vitro</i> de embriones de alpaca.

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

3.1 Antecedentes

- a) En un estudio realizado por Quispe *et al.*³ se evaluó la influencia de la FSH junto con otras gonadotropinas, hormona luteinizante (LH) y la gonadotropina coriónica equina. Usó 0.25 ug/mL de FSH en el medio de maduración. El objetivo fue evaluar la influencia de estas hormonas sobre la maduración *in vitro* de ovocitos y segmentación de embriones de alpacas. Para la maduración *in vitro* se utilizó ovocitos de grado A y B. Los resultados mostraron mayor tasa de embriones en el tratamiento combinado de tres hormonas logrando 22.4%, y 17% con la combinación de FSH y LH. Se concluyó que la combinación de gonadotropinas tiene un efecto positivo sobre la tasa de segmentación de embriones de alpaca.
- b) Landeo *et al.*¹⁸, realizaron un estudio con alpacas con el objetivo de comparar la calidad morfológica y la competencia de desarrollo *in vitro* de complejos cúmulos-ovocitos de alpacas vivas versus alpacas sacrificadas. Para la recolección de ovocitos se utilizó la técnica de aspiración manual de ovarios recolectados en el matadero y para hembras superestimuladas se usó el método recuperación de ovocitos OPU (Ovum Pick Up). Los ovocitos recolectados en el matadero se seleccionaron de grado I-III, se maduraron en un medio de maduración *in vitro* con 0.5 ug/mL de FSH durante 26 h y se fertilizaron con espermatozoides frescos de alpaca. Los cigotos fueron cultivados durante 7 días. Dando como resultado 39.3% de blastocisto. La calidad morfológica fue mayor de aquellos ovocitos de matadero, pero se observó mejor potencial en los ovocitos obtenidos de alpacas vivas.
- c) Otro estudio examinó los efectos de los cigotos de alpaca cultivados *in vitro* e *in vivo*. Para ello, se utilizaron ovocitos de animales que habían sido sacrificados en el camal y transportados al laboratorio. En el medio de maduración *in vitro* se administró gonadotropina coriónica equina (eCG) 2 UI/mL y gonadotropina coriónica humana (hCG) 10 UI/mL. La evaluación se realizó 42 horas después de la fecundación. Para el cultivo *in vitro* se utilizó 30 cigotos para cultivo *in vivo* se utilizó 32 cigotos. Se evaluó a las 120 h después de la fertilización y se observaron 8 (7.3%) blastocistos *in vitro* y a las 168 h se observaron 7 (6.4%) blastocistos *in vivo* en el oviducto de las alpacas



receptoras. Al finalizar en el cultivo *in vitro* se observó que los embriones se encontraban en diferentes estadios, algunos experimentaban un proceso de degeneración y deformación. Los cigotos cultivados *in vivo* mostraron resultados más consistentes ¹⁹.

- d) Mamani en el 2022 ² evaluó hasta el estadio de blastocisto la influencia de los factores embriotróficos de desarrollo epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) y la tensión de oxígeno en el desarrollo *in vitro* de ovocitos de alpaca. los ovocitos fueron recolectados de animales sacrificados. La maduración se hizo por 32 horas y en el medio se usó gonadotropinas como la hormona folículo estimulante y la hormona luteinizante. La fertilización se hizo con semen fresco y se cultivó por 48 horas. Sus resultados muestran 14.1% de blastocistos con EGF a una tensión de oxígeno al 6%.
- e) Se examinaron la tasa de maduración y el desarrollo de los embriones creados por fecundación *in vitro* a diferentes tiempos para el cultivo *in vitro* de ovocitos en llamas. Se recogieron 672 ovocitos, que maduraron en 28, 36 y 42 horas respectivamente. Obteniendo el resultado más alto en tasa de blastocisto a las 42 horas resultando en un 12.5% de desarrollo seguido de 11.6 a las 36 horas de maduración. Concluyendo así que estos dos tiempos de maduración son mejores que aquellos que fueron madurados en menos tiempo ²⁰.

3.2 Marco teórico

3.2.1 Generalidades de la alpaca

La población de alpacas en Perú según CENAGRO del 2012 ²¹, reporto más de 3 millones de alpacas, y en el 2022 MIDAGRI reporto 4.8 millones de alpacas, siendo el mayor productor de esta especie ²². En el Perú la alpaca es altamente valorada por que cumple un rol importante en la economía de las comunidades alto andinas, siendo la carne y la fibra de alta calidad como la principal fuente de ingresos ²³. Desde el reporte de la primera gestación mundial de llamas y alpacas, los cuales fueron producidos mediante fertilización *in vitro* ^{15,24}, ha motivado a muchos investigadores a producir crías vivas mediante la transferencia de embriones. En el 2016, Landeo et al. reporto una cría nacida viva de llama luego de 15 transferencias entre ellos 9 embriones de alpaca y 6 de llama con receptoras llamas. Demostrando que es posible obtener crías vivas de los camélidos sudamericanos mediante producción *in vitro* de embriones ²⁴.



3.2.2 Producción de embriones *in vitro*

Todo el proceso de la producción de embriones consta de tres etapas, que son la maduración *in vitro*, fecundación *in vitro*, y cultivo de los posibles cigotos ²⁵.

3.2.2.1 Maduración *in vitro*

Esta es una técnica mediante la cual los ovocitos son removidos del folículo y son cultivados en medios especiales que les otorgue condiciones apropiadas que ayuden a alcanzar hasta su estadio de metafase II y puedan seguir con sus funciones para la fecundación y el desarrollo embrionario. Existen diferentes medios para la maduración *in vitro* de ovocitos, en su composición presentan una mezcla de sales orgánicas, vitaminas, glucosa, aminoácidos, entre otros. El medio más usado es el TCM-199, el cual ha presentado mejores resultados. Además de la adición de sustratos exógenos que influyen en la maduración, a este medio también se añade las gonadotropinas, que mejoran las tasas de maduración, fertilización y la capacidad de desarrollo de los embriones *in vitro* ²⁶.

3.2.2.2 Fecundación *in vitro*

La fecundación *in vitro* es una técnica asistida que consiste en el co-cultivo de espermatozoides y óvulos en condiciones controladas para dar inicio el desarrollo de un embrión, para esto los espermatozoides deben cumplir ciertos requisitos como: estar vivos, tener movilidad y la morfología normal ²⁷. Para lograr una fecundación *in vitro* exitosa ambos gametos deben ser debidamente preparados. Los ovocitos deben estar en metafase II y los espermatozoides deben capacitarse, clasificarse y lavarse antes de ser cultivados con los ovocitos ²⁸. La fertilización *in vitro* ofrece la posibilidad de obtener embriones a un costo bajo con fines de estudio o propósitos comerciales ²⁹.

3.2.2.3 Cultivo de embriones *in vitro*

El cultivo embrionario es el paso más prolongado de la producción *in vitro* de embriones, incluye todo un conjunto de técnicas, protocolos y equipos que simulen las condiciones naturales en las cuales se desarrollan los embriones para lograr resultados eficientes ²⁵. Además, es el momento en el que el porcentaje de pérdidas es mayor. Esto puede atribuirse a variables como los componentes del medio de cultivo, la temperatura, la osmolaridad,

el pH, los gases del incubador, el tiempo y las condiciones de cultivo. Estos factores tienen un impacto significativo en el desarrollo de los embriones, determinando los cambios responsables de su menor calidad en comparación con los embriones cultivados *in vivo* ²⁶.

3.2.3 Medios de cultivo

En los medios de cultivo se utilizan formulas similares de compuestos energéticos, como la glucosa, el lactato o el piruvato. Entre ellos se incluyen vitaminas, antioxidantes, agentes quelantes, hormonas o factores de crecimiento, antibióticos, macromoléculas biológicas como la albúmina de suero bovino y macromoléculas sintéticas como el alcohol polivinílico ³⁰.

3.2.3.1 Medio básico de maduración TCM-199

El medio de cultivo celular (TCM-199) es uno de los medios más utilizados para el cultivo de ovocitos y embriones de diversas especies domésticas. La ventaja de este medio es el alto contenido de aminoácidos, vitaminas y estimulante del crecimiento. Este medio también contiene tampón Hepes, un medio tamponado de fosfato-bicarbonato, para mantener el pH óptimo y temperatura óptima para la mayoría de las células cultivadas. Se ha descrito concentraciones óptimas de tampón Hepes, 25 mM en medio de cultivo, teniendo concentraciones más bajas el efecto amortiguador es menor y siendo tóxica en concentraciones mayores ³¹.

3.2.3.2 Macromoléculas

El suero fetal bovino más comúnmente usado se obtiene de la sangre, el cual pasa por un tratamiento de calor para inactivar su sistema complemento de lisis celular. Se trata de un complejo suplemento usado en la producción *in vitro* de embriones, este suplemento contiene proteína, factores de crecimiento, hormonas, aminoácidos, glucosa, inhibidores y tripsina, lípido entre otros ³¹. La albúmina sérica bovina es una proteína plasmática de carácter ácido, soluble en agua. Debido a los grupos reactivos de su molécula, es capaz de unirse a diversas sustancias, como hormonas, ácidos grasos, etc., y transportarlas a los órganos a los que están destinadas en la sangre. Las dos proteínas más comunes en el líquido oviductal son la inmunoglobulina G y la inmunoglobulina A²⁹. Tanto el suero como la albúmina sérica bovina tiene un rol similar como suplemento proteico.

Además de nutrir también protege de los efectos tóxicos asociados a cambios de pH, presencia de metales pesados, endotoxinas y actividad de proteólisis ³².

3.2.3.3 Antibióticos

Los antibióticos utilizados para la producción de embriones *in vitro* deben ser compatibles con los ingredientes del medio de cultivo. Deben ser atóxicos, capaces de inhibir y controlar la contaminación bacteriana y fúngica sin alterar la osmolaridad ni el pH del medio. La penicilina G (50 a 100 UI/ml), la estreptomycin (50 a 100 g/ml) y la kanamicina (100 g/ml) son los fármacos más utilizados. Para el control fúngico, también se utilizan la micostatina (50 U/ml) o la anfotericina B (0,25 g/ml) ³¹.

3.2.3.4 Aminoácidos

Los aminoácidos desempeñan un papel crucial en el control del desarrollo embrionario; son incorporados por determinados transportadores de membrana, que se regulan en función de la fase de desarrollo o en respuesta a señales externas. Mientras que los aminoácidos esenciales mantienen a los embriones con más de ocho células, los aminoácidos no esenciales favorecen el desarrollo en las primeras fases. Los requisitos únicos de las células embrionarias causan esta diferencia en la utilización de aminoácidos: las células del trofoblasto, que constituyen la placenta fetal, prefieren los aminoácidos esenciales y la glutamina, mientras que la masa celular interna, que produce el feto, favorece los aminoácidos no esenciales ²⁹.

3.2.3.5 Hormonas

La suplementación de los medios con hormonas tiene como base lo que ocurre *in vivo*, las más comúnmente usadas son la LH y la FSH. Ambas hormonas tienen un rol importante en el desarrollo folicular del ovocito, estos aumentan la capacidad de desarrollo de los ovocitos maduros en medios libres de sueros reanudando la meiosis del ovocito para que alcance la metafase II ³³.

3.2.4 Hormonas gonadotrópicas

Las gonadotropinas desempeñan un papel importante en el crecimiento folicular, la maduración meiótica, influencia en el contenido y la capacidad de la síntesis de proteínas³⁴ y son necesarias para promover un desarrollo adecuado de los embriones en un entorno de cultivo *in vitro*³⁵. Para lograr un más éxito en el proceso, es esencial suplementar el medio de maduración con concentraciones que permitan a la reanudación de la meiosis sin provocar anomalías cromosómicas⁷. Las gonadotropinas en el medio de maduración se administran de forma individual o combinada, con el objetivo de simular condiciones similares a las que ocurren de forma natural en el ciclo reproductivo de los animales³⁶.

La FSH y la LH comúnmente usadas son hormonas glicoproteicas producidas y liberadas por la hipófisis anterior y liberadas al torrente sanguíneo para llegar a su órgano diana que son las gónadas³⁷. Se encargan de regular la función de las gónadas femeninas y masculinas³⁸. En la fase folicular estimulan el desarrollo folicular asegurando la proliferación de las células de la granulosa a través de la FSH. Si la estimulación gonadotrópica es insuficiente, el desarrollo de folículo no continúa, sino que permanece en la fase antral temprana. En estas fases antrales la FSH es fundamental para el crecimiento folicular, previniendo la atresia folicular³⁹.

3.2.4.1 Hormona folículo estimulante

La hormona folículo estimulante (FSH) es secretada por la glándula pituitaria anterior⁴⁰, su función principal es la estimulación de la maduración del folículo, aunque las etapas iniciales se producen en ausencia de esta, es necesario para completar su maduración y dar lugar a la ovulación. En condiciones naturales, la hormona FSH se encarga del crecimiento folicular, permite la división celular de la capa de la granulosa y formación de la cavidad antral⁴¹.

El mecanismo de acción que se produce *in vivo* es la base para utilizar la FSH en la maduración *in vitro*⁴². La FSH es responsable de la formación de células del cumulus a través de la síntesis de piruvato y ácido hialurónico⁴³ mediante la adición de suero fetal. En el cultivo *in vitro*, esta hormona desempeña una función importante. Promueve la maduración y proliferación de las células de la granulosa directamente asociadas al ovocito, estimula la secreción de progesterona y estradiol, y estimula la secreción de estrógenos a través de la inducción de receptores de LH⁴².



Además, mantiene la morfología normal del ovocito y de las células de la granulosa ^{26,33}.

En los camélidos sudamericanos, la FSH en los medios de maduración ha sido utilizada en diferentes concentraciones, individual o en combinación con otras hormonas, como en alpacas 0.5 ug/mL individualmente ^{17,24}, o en combinación 0.5 ug/mL de FSH más 10 ug/ml de gonadotropina coriónica humana ⁴⁴ y en llamas se utilizó 0.5 ug/mL de FSH ⁴⁵, 0.02UI/mL de FSH ²⁰; en dromedarios se reportaron concentraciones de 1 ug/mL de FSH ⁴⁶, 10 ug/mL de FSH ⁴⁷, 10 mg/mL FSH ⁴⁸.

3.2.4.2 Hormona luteinizante

In vivo, la hormona luteinizante (LH) provoca la ruptura del folículo, lo que conduce a la ovulación. Gracias a esta hormona, el cuerpo lúteo crece y empieza a segregar progesterona, una hormona esencial para el embarazo ³⁷.

La hormona liberadora de gonadotropina estimula la liberación de la hormona luteinizante; esta hormona se secreta y se sintetiza en los gránulos secretores. Cuando se genera un pulso de GnRH, la hipófisis responde con un pulso de LH. La LH aumenta con la frecuencia de secreción de GnRH ⁴⁹.

En la producción *in vitro* esta hormona se usa por su efecto de producir la reanudación meiótica por lo tanto la reanudación espontanea de la maduración. Además, se ha demostrado que las concentraciones elevadas de LH mejora la viabilidad de los ovocitos madurados *in vitro*, en bovinos se puede usar hasta 100 UI/mL durante la maduración sin comprometer el desarrollo embrionario ³⁵.

3.2.5 Composición estructural de las gonadotropinas

Las hormonas FSH, LH, hCG y eCG pertenecen a un grupo de hormonas que comparten una estructura molecular similar. Estas hormonas se generan a partir de una subunidad alfa, la cual es idéntica en una especie animal específica, y una subunidad beta que es única para cada hormona. Las dos subunidades están unidas por enlaces disulfuro. Los carbohidratos asociados a estas glicoproteínas pueden variar según la edad, la estación o el estado fisiológico, lo que se conoce como microheterogeneidad. Este fenómeno ha cobrado relevancia recientemente, ya que se ha descubierto que la vida media o la actividad biológica de una hormona puede verse influenciada por el tipo de carbohidratos presentes en su estructura molecular ⁴⁹.

La FSH es una glicoproteína producida por las células basofílicas de la glándula pituitaria anterior. Similar a otras glicoproteínas como la LH, TSH y HCG, la FSH está formada por dos subunidades denominadas alfa y beta. Las hormonas de este tipo, que poseen una subunidad beta, presentan una estructura bastante similar, lo que hace que las propiedades biológicas e inmunológicas de cada una dependan exclusivamente de su subunidad beta ⁵⁰.

3.2.6 Desarrollo de embriones

3.2.6.1 Segmentación o división embrionaria

La segmentación o división embrionaria es un proceso que tiene lugar tras la fecundación, en el cual los cigotos experimentan múltiples divisiones mitóticas. Durante estas divisiones, cada célula hija, conocida como blastómero, recibe un conjunto completo de cromosomas sin que se produzca un aumento en la masa celular. Esta serie de divisiones continúa a lo largo del período de pausa. Al principio, las divisiones ocurren de manera simultánea en todos los blastómeros; sin embargo, una vez que se rompe esta sincronización, los blastómeros comienzan a dividirse de forma independiente. Cuando el embrión cuenta con entre 9 y 16 blastómeros, se le denomina mórula ³².

3.2.6.2 Mórula

La mórula compacta, que se puede observar tras 5 a 6 días de cultivo, contiene aproximadamente entre 32 y 64 blastómeros. Estos blastómeros están fuertemente unidos, formando una masa densa que ocupa entre el 60 y el 70% del espacio previtelino. Aunque los blastómeros mantienen su potencial, la compactación es una señal distintiva de la diferenciación embrionaria ⁵¹.

3.2.6.3 Blastocisto temprano

El blastocisto temprano se puede observar alrededor de los 7 días, y en esta etapa, el número de blastómeros es de aproximadamente 100 a 200 células. Este desarrollo se caracteriza por el inicio del intercambio de líquidos en las células trofoectodérmicas o trofoblastos, lo que lleva a la formación de una cavidad interna conocida como blastocele, y da lugar a la aparición de un anillo sellado ⁵².

3.2.6.4 Blastocisto expandido

En los días 7 a 8 luego del cultivo se puede observar un blastocisto agrandado, con más de 200 células. El diámetro aumenta significativamente, lo que causa que la zona pelúcida adelgace y el aumento de presión por el crecimiento del blastocisto provoca la ruptura, dando lugar a la protrusión⁵¹.

3.2.6.5 Blastocisto protruido

Entre los días 8 y 9, se puede observar un blastocisto que contiene entre 200 y 800 células. En esta etapa, los embriones se han desprendido de la zona pelúcida. La forma del blastocisto puede ser redonda, con un blastocele bien definido o en estado colapsado. Es posible transferir blastocistos maduros, pero al estar sin zona pelúcida son frágiles y pegajosos, por tal razón es más común transferir estadios de mórulas tempranas a blastocistos³².

3.2.7 Evaluación embrionaria

La evaluación embrionaria es importante, porque indica la viabilidad del embrión antes de la transferencia. La mayoría de los protocolos se basan en las normas estándares desarrollados por el instituto de transferencia de embriones³¹. Un embrión con un buen pronóstico de implantación alcanzará el estadio de blastocisto el día 5 o 6, pero esto depende del sistema de cultivo empleado. Los embriones de desarrollo lento alcanzan esta etapa el día 7 o incluso el día 8. En bovinos generalmente es en 7 días⁵³.

3.2.7.1 Evaluación morfológica

Los parámetros evaluados incluyen el tamaño, la forma y el grado de compactación de la masa celular interna, el nivel de expansión del blastocele, y la estructura de las células del trofoectodermo⁵⁴.

3.2.7.2 Grado de expansión de blastocele

La expansión del blastocele suele estar relacionada con una adecuada maduración trofoblástica y una buena tasa de implantación. Este parámetro es de difícil catalogación porque depende del tiempo, más aún del estadio de colapso blastocélico. Si se observa, la evaluación debe retrasarse unas horas porque frecuentemente suele recuperar su morfología en pocos

minutos y en pocas horas el blastocisto puede expandirse significativamente debido al adelgazamiento de la zona pelúcida ⁵³.

3.2.7.3 La estructura de las células del trofoectodermo

La pared del blastocele o cavidad del blastocisto está formada por una sola capa de células cohesivas. El epitelio homogéneo con células elípticas, el epitelio irregular, el epitelio irregular con células escasas y el epitelio irregular con células escasas se clasifican en función del número, la forma y el grado de cohesión. La calidad morfológica del trofoectodermo representa una buena tasa de implantación siempre que la morfología de la masa celular interna sea normal ⁵⁵.

3.2.7.4 Clasificación de la calidad embrionaria

Gibbons *et al.* ⁵⁶ y Souza *et al.* ³¹ clasifican la calidad de embriones en:

Grado I (Excelente). Embrión ideal con masa embrionaria simétrica y esférica, con blastómeros de tamaño, color y textura uniforme. Los blastómeros son claramente visibles y la zona pelúcida está intacta. No existen defectos visibles.

Grado II (Bueno). El embrión tiene una pequeña cantidad de vesículas y muy pocos blastómeros separados de la masa celular; además, presenta irregularidades moderadas en cuanto a tamaño, color y densidad. Su forma puede ser un poco impredecible.

Grado III (Regular). Los detritus celulares, la forma irregular, el color muy oscuro o muy claro y/o el ligero agrietamiento de la zona pelúcida son defectos claros en la masa o el tamaño, el color y la densidad del embrión. Hay vesículas, blastómeros desprendidos y algunas células degeneradas.

Grado IV (Malo). Además de retraso en el desarrollo, ruptura grave de la zona pelúcida -el embrión puede estar parcialmente fuera de ella-, forma muy asimétrica, inclinación a la desintegración con granulación y vacuolización de los blastómeros, y defectos que corresponden al grado III. Se incluyen la degeneración y los estadios de hasta ocho células. Este grupo de embriones no puede transferirse.

3.3 Marco conceptual

- a) **FSH:** es una hormona hipofisiaria, que tiene como efecto la maduración del ovocito. Se utiliza de manera fundamental en la producción de embriones *in vitro* porque actúa en el mantenimiento de la morfología normal del ovocito y en la proliferación celular. Su uso en la maduración *in vitro* es porque se busca recrear lo que ocurre *in vivo* ⁴¹.
- b) **Blastocisto:** es un embrión con desarrollo avanzado que se forma en el día 7 del cultivo *in vitro*, además representa una fase crítica en el desarrollo inicial preparando el camino para la implantación. Tiene una estructura esférica y está conformada por 200 células organizadas en una masa interna, forma una cavidad donde acumula un líquido denominada blastocèle. Se forma a partir del cigoto como resultado de la fecundación *in vitro* ⁵³.
- c) **Tasa:** La proporción de casos, frecuencias o sucesos de una categoría concreta con respecto al número total de observaciones es un número que se multiplica por 10, normalmente 100 o 1000 ⁵⁷.
- d) **Medio de cultivo:** es una formula enriquecida, diseñada específicamente para el crecimiento, mantenimiento y estudio de la producción *in vitro*, contiene compuestos proteicos y energéticos que son fundamentales para el desarrollo de los ovocitos sin causar ningún tipo de alteración ³⁰.
- e) **Maduración *in vitro*:** es una técnica en la se realiza la maduración de los ovocitos fuera ambiente natural ovárico, esta técnica se realiza en condiciones controladas dentro de un laboratorio, en un medio especial que contiene todo lo necesario como proteína, energía y sustratos como aminoácidos, hormonas y una temperatura optima de tal modo que no afecte al ovocito en su desarrollo y calidad ⁵⁸.
- f) **Fertilización *in vitro*:** es una técnica de reproducción asistida que consiste en la unión del espermatozoide y el ovulo maduro en un ambiente controlado fuera del cuerpo de la hembra ²⁷.
- g) **Cultivo de embriones *in vitro*:** es parte de la biotecnología reproductiva que se usa para investigar el desarrollo de embriones de calidad en un ambiente controlado para luego hacer la transferencia de embriones a hembras receptoras previamente preparadas ⁵⁹.

- h) **Cigoto:** es la primera célula diploide que resulta de la unión de dos células sexuales, espermatozoide y ovulo después de la fecundación. El cigoto da inicio al desarrollo embrionario mediante la división celular, formando un embrión ⁶⁰.

CAPÍTULO IV

METODOLOGÍA

4.1 Tipo y nivel de investigación

Dado que el investigador interviene y altera la variable de estudio para observar los efectos, el presente trabajo de investigación es de tipo experimental ⁶¹.

El nivel de investigación es explicativo ya que busca causas o razones de un fenómeno ⁶². Explica el comportamiento de una variable en función de otra(s); por ser estudios de causa-efecto ⁶³.

4.2 Diseño de la investigación

El diseño de la presente investigación fue experimental. La misma que se caracteriza por la manipulación intencional de una o más variables ^{61,64}. Es importante precisar, el diseño de investigación se refiere a un conjunto de planes o estrategias de procedimiento para obtener información con el objetivo de responder al planteamiento de problema⁶⁴.

Para la presente investigación los ovocitos se recolectaron de alpacas sacrificadas en el matadero, se evaluaron y clasificaron en tres categorías, de los cuales las de categoría A y B fueron seleccionados como aptos. Luego estos fueron distribuidos en dos grupos, tratamiento 1 (T1) y tratamiento 2 (T2). A cada tratamiento se le administró diferente concentración de FSH como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 2

Distribución de tratamiento de hormona folículo estimulante.

Tratamiento	Gonadotropina	Concentración
T1	FSH	0.05 UI/ mL
T2	FSH	0.10 UI/ mL

4.3 Población y muestra

La población estuvo compuesta por ovocitos de las alpacas beneficiadas del matadero de Huancavelica. El método muestral fue no probabilístico, cuyo tamaño muestral fue por



conveniencia compuesto por 640 ovocitos de categoría A y B aptos para cultivo *in vitro* de ovocitos.

4.4 Procedimiento

Según la Real Academia Española ⁶⁵, el término procedimiento se considera como sinónimo de método, técnica, práctica; mientras el instrumento se refiere a cosa o persona de que alguien se sirve para hacer algo o conseguir un fin. Considerando las terminologías mencionadas, los procedimientos del presente estudio se describen en el siguiente numeral.

4.5 Técnica e instrumentos

4.5.1 Colección de ovarios y recuperación de ovocitos

Los ovarios fueron colectados de alpacas sacrificadas en el matadero, los que fueron sumergidos a solución fisiológica al 0.9% suplementada con antibióticos, luego fueron transportados al laboratorio a 37 °C. Al arribo, los ovarios fueron colocados a vaso precipitado que contenía NaCl donde fueron lavados. Los ovocitos fueron colectados mediante aspiración utilizando jeringa de 10 mL con aguja de 21 G, todo el contenido aspirado se colocó a tubos de 15 mL, luego el sedimento se colocó sobre una placa Petri, con apoyo del estereomicroscopio se buscó los ovocitos, trasladando con micropipeta hacia otra placa Petri donde contenía solución tamponada (PBS) adicionada con albúmina sérica bovina al 2%, allí se realizó el lavado de los ovocitos en gotas de PBS en repetidas veces.

4.5.2 Evaluación de ovocitos

La evaluación de ovocitos se realizó en gotas de PBS sobre placa Petri sostenidas sobre una platina térmica a 37 °C utilizando un estereomicroscopio. Los ovocitos se agruparon, considerando la descripción de Hawk y Wall ⁶⁶., en tres grupos, categoría A considerado de buena calidad; categoría B, considerado de calidad intermedia; categoría C de mala calidad. Los ovocitos de categoría A y B fueron considerados aptos para maduración *in vitro*.

4.5.3 Maduración *in vitro*

Los ovocitos se dispusieron en placas de Petri en grupos de 10-20 ovocitos en gotas de 80 µL. Como medio de maduración se utilizó el medio de cultivo tisular 199 (TCM-199). Contenía 10% de suero bovino fetal, piruvato sódico 0,2 mM, cisteína 0,6 mM, glutamina 0,25 mM, EGF 10 ng/mL; 17β estradiol 1 ug/mL, LH 5 g/mL, 0,05 UI/mL de FSH en T1 y 0,10 UI/mL de FSH en T2, y gentamicina 50 g/mL.

Para la maduración *in vitro*, se cubrió con aceite mineral y se mantuvo durante 36 horas en una atmósfera de aire humidificado con un 5% de CO₂ a 38,5 °C.

4.5.4 Fertilización *in vitro*

Para la fecundación *in vitro* se utilizaron espermatozoides epididimarios de alpacas macho procedentes del matadero, según el método descrito por Ruiz et al.⁶⁸. Los espermatozoides-TALP se utilizaron en placas Petri con los siguientes ingredientes: CaCl₂ 2 mM, KCL 3,1 mM, MgCl₂.6H₂O 0,4 mM, NaH₂ PO₄.H₂O 0,3 mM, ácido láctico 21,6 mM, NaCl 100 mM, piruvato sódico 1 mM, NaHCO₃ 25 mM, HEPES 10 mM, fracción BSA 0,6% (p/v). Se recuperaron secciones de cola epididimaria utilizando estos ingredientes. Se utilizó la técnica del swing-up para completar la capacitación espermática. Posteriormente, el precipitado final de semen se suspendió con Fert-TALP (CaCl₂ 2 mM, KCL 3,2 mM, MgCl₂ .6H₂O 0,5 mM, NaH₂ PO₄.H₂O 0,4 mM, ácido láctico 11 mM, NaCl 114 mM, piruvato sódico 0. 2 mM, NaHCO₃ 25 mM, penicilamina 20 mM, hipotaurina 10 mM, epinefrina 1 mM, BSA sin ácidos grasos al 0,6% (p/v) y 10 µg/mL de heparina y 50 mg/mL de gentamicina, hasta una concentración final de 1,0x10⁶ espermatozoides/mL. Tras ser lavados con PBS suplementado con BSA, los ovocitos expandidos se transfirieron a gotitas de Fert-TALP de 80 µL, que se cubrieron con aceite mineral. Los gametos se incubaron juntos a 38,5 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y alta humedad durante.

4.5.5 Cultivo *in vitro* de embriones

El cultivo de embriones se realizó considerando las técnicas descritas por Landeo et al.¹⁸, con ligera modificación. Después de 18 horas de la fertilización, se procedió a denudar los presuntos cigotos mediante el pipeteo durante 3 min. Posteriormente, se realizaron lavados en gotas sucesivas con medio SOFm-Hepes. Luego, se cultivaron en grupos de 20 a 30 cigotos en gotas de 80 uL/mL de medio de cultivo SOFm-IVC el cual fue suplementado con suero fetal bovino 10%, aminoácidos esenciales BME 0.13%, aminoácidos no esenciales MEN 0.063%, L-glutamina 1 mM, insulina 10% y gentamicina 50 µg/mL. Estos cultivos se mantuvieron a las mismas condiciones descritas para la fertilización *in vitro*. La evaluación de los blastocistos se realizó a los 7 días de cultivo.

Dentro de los cultivos consecuentes de maduración de ovocitos, fertilización y cultivo de embriones *in vitro*, normalmente en los procesos de manipulación, existe



pérdidas de ovocitos, cigotos o embriones, en este estudio para la maduración se consideró $n = 640$ ovocitos, mientras la evaluación de blastocistos se realizó con $n = 583$ embriones, la diferencia se atribuye al proceso de manipulación *in vitro*.

4.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó InfoStat v. estudiantil ⁶⁷. La variable de respuesta fue la tasa de blastocisto, la variable independiente fue las concentraciones de FSH. Previo al análisis de los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk), homogeneidad de varianzas (Levene). Para comparar los dos grupos de tratamiento se utilizó la prueba de t de Student para dos muestras independientes, bilateral, considerando el nivel de significancia de 0.05 ^{61,68}.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_c^2}{n_1} + \frac{s_c^2}{n_2}}}$$

t: Estadístico t calculada

$\bar{x}_1; \bar{x}_2$: medias muestrales

s_c^2 : varianza común

n = número de observaciones

$$s_c^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Análisis de resultados

a) Tasa de blastocisto con concentración de FSH 0.05 UI/mL

Los resultados del porcentaje de blastocisto a los 7 días de cultivo de embriones *in vitro*, producto de la adición en el medio de maduración *in vitro* de la gonadotropina FSH, se muestran en la Tabla 3.

Se obtuvo alrededor de 22% (17.5-30.0%) de blastocistos con el tratamiento de la suplementación de 0.05 UI/mL de la hormona folículo estimulante al medio de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca.

b) Tasa de blastocisto con concentración de FSH 0.10 UI/mL

Se encontró alrededor de 24% (13.3-32.5%) de blastocistos con el tratamiento de la suplementación de 0.10 UI/mL de la hormona folículo estimulante al medio de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca.

Las dos concentraciones 0.05 UI/mL y 0.10 UI/mL de FSH, suplementadas en medio de maduración *in vitro* de ovocitos, tuvieron tasas de blastocisto similares ($p > 0.05$) en cultivo de embriones de alpaca *in vitro*.

Tabla 3

Porcentaje de blastocisto cultivados *in vitro* en alpacas.

Tratamiento	Gonadotropina	Presuntos cigotos (n)	Repeticiones	Tasa de blastocisto (media $\pm$ DE)	Rango (%)	
					Min	Max
T1	FSH 0.05 UI/mL	281	6	22.32 $\pm$ 4.22 ^a	17.5	30.0
T2	FSH 0.10 UI/mL	302	6	24.23 $\pm$ 7.30 ^a	13.3	32.5

Superíndices con letras iguales dentro de la columna no expresan diferencia ($P > 0.05$).



5.2 Contrastación de hipótesis

H₀: La media de tasa de blastocisto con la concentración de 0.05 UI/mL de FSH, es similar a la media de tasa de blastocisto con la concentración de 0.10 UI/mL de FSH suplementados en el medio de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca.

H_a: La media de tasa de blastocisto con la concentración de 0.05 UI/mL de FSH, no es similar a la media de tasa de blastocisto con la concentración de 0.10 UI/mL de FSH suplementados en el medio de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca.

De acuerdo a los resultados mediante prueba de inferencia para dos muestras prueba de T bilateral se obtuvo un valor de $p = 0.590$, lo cual indica que no hay diferencia estadística con nivel de significación de 5%. Por lo tanto, bajo las condiciones del presente experimento, con la concentración de 0.05 UI/mL o 0.10 UI/mL de FSH, se obtienen similares de tasas de blastocisto de alpaca cultivados *in vitro*.

5.3 Discusión

Este experimento, evaluó el efecto de la suplementación de dos concentraciones de FSH en el medio de maduración de ovocitos de alpaca, sobre la tasa de blastocisto en el día 7. Entre ambos tratamientos no hubo diferencia significativa, encontrándose más del 20% de tasa de blastocisto de cultivo *in vitro* de presuntos cigotos.

Los resultados del presente experimento, respecto a otras publicaciones en alpacas sobre tasa de blastocisto, son similares a 29.1%¹⁷ y 21.2%⁶⁹, en ambas investigaciones usaron 0.5 ug/ml de FSH luego de 32 y 38 horas de maduración respectivamente. Por otro lado, otros investigadores obtuvieron mayores tasas de blastocistos, 39.3%¹⁸ y 30.5 %⁶⁹ con 26 y 32 horas de maduración *in vitro*, respectivamente. Otras publicaciones, reportan tasas menores a la presente investigación, 14.1% usando FSH y LH en el medio de maduración², 9.2% al usar una concentración de 0.02 UI/ml de FSH⁷⁰, 11.9% con 0.5 mg/mL de FSH⁷¹, 3.6% usando 0.5 ug/ml de FSH⁷² en alpacas, respectivamente. Mientras en llamas se reportaron 11.65% y 12.51% de tasa de blastocisto a 38 y 42 horas de maduración *in vitro*²⁰. En camélidos, se ha logrado un éxito limitado utilizando tecnologías, y los porcentajes de blastocistos oscilaron entre 0% y 35% tanto en llamas como en dromedarios⁸, y se reportó solo una cría viva nacida de llama hasta el momento²⁴.

Los resultados de tasas de blastocisto mayores podrían atribuirse al uso de semen fresco empleado en la fertilización *in vitro*, porque el semen fresco aún conserva los componentes necesarios (proteínas, antioxidantes y fuentes energéticas) presentes en el plasma seminal, que favorecen la capacidad de fertilización del espermatozoide⁷³. Por otro lado, los



tiempos de maduración *in vitro*, podrían tener un efecto negativo en la calidad del embrión, porque el envejecimiento de los ovocitos es mayor cuando el tiempo de maduración *in vitro* es prolongado y ocurre un aumento de la anomalía cromosómica y disfunción de los orgánulos celulares, influyendo en la calidad de los ovocitos ⁷⁴. Esto podría ser respaldado por Landeo et al. ¹⁸ el cual obtuvo 39.3% de blastocistos con 26 horas de maduración *in vitro* ¹⁸. Además, estas diferencias podrían atribuirse a varios factores, entre ellos, el tiempo de transporte, tiempo de maduración, diferentes concentraciones de las gonadotropinas, diversidad de hormonas usadas entre otros factores. Por lo que, todavía no está claro la utilización de diferentes concentraciones de gonadotropinas en los procesos de producción de embriones *in vitro* en alpacas.

El tiempo de transporte desde la obtención del ovario hasta el cultivo de los ovocitos es crucial ⁷⁵. Se ha demostrado que, en bovinos, el tiempo de transporte de 4 a 5 horas tiene efecto benéfico sobre la calidad del ovocito y competencia de desarrollo del embrión ⁷⁶. En el vacuno las tasas de desarrollo de blastocistos son solo del 30% al 40% a pesar de que la técnica de la producción *in vitro* de embriones está más estandarizada. En cerdos, la producción *in vitro*, aún presenta problemas y bajas tasas de formación de blastocistos. En cabras y ovejas existen relativamente pocos estudios sobre producción *in vitro*, pero el porcentaje de blastocistos producidos a partir de la maduración *in vitro*, fertilización *in vitro* y el cultivo *in vitro* oscila entre el 20% y el 30%.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- Conclusión general, con las dos concentraciones de 0.05 o 0.10 UI/mL de FSH, suplementadas en medio de maduración *in vitro* de ovocitos, se alcanzó similares tasas de blastocisto en alpacas.
- Conclusión específica 1, con la concentración de 0.05 UI/mL de FSH, suplementadas en medio de maduración *in vitro* de ovocitos, se alcanzó mayor a 15% de tasa de blastocisto en alpacas.
- Conclusión específica 2, con la concentración de 0.10 UI/mL de FSH, suplementadas en medio de maduración *in vitro* de ovocitos, se alcanzó alrededor de 20% de tasa de blastocisto en alpacas.

6.2 Recomendaciones

- Se recomienda realizar más estudios con diferentes concentraciones de FSH sola o en combinación con otras gonadotropinas en la maduración *in vitro* de ovocitos y sus efectos en blastocistos cultivados *in vitro* en alpacas.
- Realizar investigaciones con concentración de 0.05 UI/mL de FSH combinada con otras gonadotropinas, suplementadas al medio de maduración *in vitro* de ovocitos, en la evaluación de segmentación de embriones cultivados *in vitro* en alpaca.
- Experimentar con concentración de 0.10 UI/mL de FSH adicionada con otras gonadotropinas, suplementadas al medio de maduración *in vitro* de ovocitos, en la evaluación de segmentación de embriones cultivados *in vitro* en alpaca.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alfredo PC, Álvaro VY, Juan ZA, Luis OM, Aída CR, Wilfredo HL. Superovulatory and embryonic response in alpacas according to the number of follicles recruited by follicular wave. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*. 2021;32(2):1–15.
2. Mamani TH. Effect of Embryotrophic Factors At Different Oxygen Tension for *in Vitro* Culture on the Embryonic Development of Alpacas Up To the Blastocyst Stage. *Granja*. 2022;36(2):113–21.
3. Quispe Gutiérrez US, Huanca Mamani T, Olivera Marocho L V. Influencia de las hormonas folículo estimulante, luteinizante y gonadotropina coriónica equina en la maduración *in vitro* de ovocitos y clivaje de embriones de alpaca. 2019;8(1):974–85. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.26788/riepg.2019.1.117>
4. Massa Guzman AM, Perez Guerra UH, Massa Palacios LA. Evaluación de las características ultrasonográficas testiculares en alpacas macho y su relación con los niveles de testosterona. 2023.
5. Huanca T. Manual del Alpaquero. INIA. Manual. 1996;156.
6. Trasorras VL, Miragaya MH. Factores que afectan el desarrollo de la fecundación *in vitro* en camélidos. *Spermova*. 2016;2(6):104–6.
7. Bahrami M, Cottee PA. Culture conditions for *in vitro* maturation of oocytes – A review. *Reproduction and Breeding* [Internet]. 2022;2(2):31–6. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.repbre.2022.04.001>
8. Moawad AR, Ghoneim IM, Darwish GM, Badr MR, El-badry DA, El-wishy ABA. Factors affecting *in vitro* embryo production: insights into dromedary camel. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*. 2020;35:119–41.
9. Pérez Durand MG, Zevallos Aragón JP, Pérez Guerra UH. Comparación de sistemas de cultivo de embriones de alpacas. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*. 2017;19(2):157–64.
10. Di Berardino C, Peserico A, Capacchietti G, Crociati M, Monaci M, Tosi U, et al. Equine chorionic gonadotropin as an effective fsh replacement for *in vitro* ovine follicle and oocyte development. *Int J Mol Sci*. 2021;22(22).
11. Salgado O R, Vergara G O, Ramírez P L. Efecto de gonadotropinas sobre la maduración y desarrollo embrionario de oocitos bovinos cultivados *in vitro*. *RevMVZ* . abril de 2010;15(1):1954–60.



12. Sirard MA, Desrosier S, Assidi M. In vivo and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. *Theriogenology*. el 1 de septiembre de 2007;68(SUPPL. 1).
13. Quispe-Gutiérrez US, Olivera-Marochó L V., Ccopa-Ccallata J, Pahuara-Farfan LE, Barragán-Condori M, Berndtson JL. Effect of fsh and ecg on alpaca (*Vicugna pacos*) oocyte maturation *in vitro*. *Int J Vet Sci*. 2021;10(3):156–61.
14. Abdoon ASS, Kandil OM, Otoi T, Suzuki T. Influence of oocyte quality, culture media and gonadotropins on cleavage rate and development of *in vitro* fertilized buffalo embryos. *Anim Reprod Sci*. 2001;65(3–4):215–23.
15. Trasorras V, Baca Castex C, Alonso A, Giuliano S, Santa Cruz R, Arraztoa C, et al. First llama (*Lama glama*) pregnancy obtained after *in vitro* fertilization and *in vitro* culture of gametes from live animals. *Anim Reprod Sci*. 2014;148(1–2):83–9.
16. Huanca L. W, Condori P. R, Chileno M. M, García H. P, Cainzo C. J, Becerra G. JJ. Effect of time of incubation on nuclear maturation and cleavage post *in vitro* fertilization of alpaca oocytes. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2014;25(4):468–76.
17. Ruiz J, Paulo Santayana R, José Mendoza M, Leandra Landeo J, Huamán E, Ticllacuri F, et al. Effect of oocyte maturation time, sperm selection method and oxygen tension on *in vitro* embryo development in alpacas. *Theriogenology* [Internet]. 2017;95:127–32. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.006>
18. Landeo L, Zuñiga M, Gastelu T, Artica M, Ruiz J, Silva M, et al. Oocyte Quality, *In Vitro* Fertilization and Embryo Development of Alpaca Oocytes Collected by Ultrasound-Guided Follicular Aspiration or from Slaughterhouse Ovaries. *Animals*. 2022;12(9).
19. Pérez Durand G, Zevallos Aragon J, Perez Guerra U. Cultivo in Vivo De Embriones De Alpacas En El Oviducto Versus Cultivo De Embriones *in Vitro*. *Spermova*. 2018;8(2):138–43.
20. Ayuque A, Justiniano E, Mendoza J, Landeo L, Ruiz J. Efecto del tiempo de maduración *in vitro* en la capacidad meiótica y desarrollo de embriones de llama. 2014;4(1):99–101.
21. CENAGRO. IV Censo Nacional Agropecuario- CENAGRO [Internet]. Lima Perú; 2012 dic. Disponible en: www.inei.gob.pe
22. MIDAGRI. MIDAGRI: El 87% de la población mundial de alpacas se encuentra en el Perú - Noticias - Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego - Plataforma del Estado Peruano [Internet]. gob.pe. 2022 [citado el 23 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/midagri/noticias/636546-midagri-el-87-de-la-poblacion-mundial-de-alpacas-se-encuentra-en-el-peru>



23. Garcia Tapia LI. Biotecnologías Reproductivas En Camelidos Sudamericanos. 2019;1–103.
24. Ruiz Bejar J. Producción y transferencia de embriones *in vitro* en Camélidos Sudamericanos: Nuevas oportunidades y desafíos. 2018;8(1):54–60.
25. Salgado-Cruz E, Lopera-Vásquez R. Essential aspects on *in vitro* fertilization techniques in cattle. Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru. 2020;31(3):1–14.
26. Castro Modesto T. Efecto del fluido folicular de alpaca en la maduración ovocitaria *in vitro* de alpaca (*Vicugna pacos*). Cybertesis [Internet]. 2018;1–99. Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/9692>
27. Reyes FF, Pichardo JEH, Flores M del CR. Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de testículos. Revista de Salud Animal, La Habana, Cuba. 2010;32(2):1–5.
28. Guillen Palomino CY. Efecto de factores de crecimiento sobre la tasa de maduración de ovocitos y desarrollo embrionario *in vitro* de alpaca. Universidad Nacional De San Cristóbal De Huamanga. [Ayacucho Peru]: Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga; 2018.
29. Mucci N, Aller JF, Kaiser GG, Hozbor F, Alberio RH. Producción *in vitro* de embriones bovinos: Suplementación de los medios de cultivo con suero. Arch Med Vet. 2006;38(2):97–104.
30. Coy P. Medios de cultivo para fecundación *in vitro*: ¿ qué les falta para ser perfectos? Revista de embriología clínica y biología de la reproducción [Internet]. 2012;17(1):44–52. Disponible en: www.asebir.com
31. Souza Neves M. Producción *in vitro* de embriones de ovinos - Manual de procedimientos. Uruguay; 2019.
32. Contreras Huamani M. Evaluación de la calidad de embriones producidos por fertilización *in vitro* en alpacas (*Vicugna pacos*). Ayacucho; 2014.
33. Málaga Chuquitaype RE. Adaptación de un protocolo de fertilización *in vitro* para alpacas (*vicugna pacos*) y su evaluación a 4200 msnm en el departamento de Puno.” [Internet]. Vol. 0, Universidad Católica de Santa María Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas Arequipa. [Arequipa - Peru]: Universidad Católica de Santa María Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas ; 2015 [citado el 25 de julio de 2024]. Disponible en: <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/3419>



- Repositorio Institucional - UNAMBA Perú

44. Huanca W. Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos como alternativas para la mejora genética. Aceptado Septiembre [Internet]. 2013;20:1–4. Disponible en: www.alpa.org.ve/ojs.index/php
45. Ratto M, Berland M, Huanca W, Singh J, Adams GP. *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes. *Theriogenology* [Internet]. junio de 2005;63(9):2445–57. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X04003784?via%3Dihub#preview-section-recommended-articles>
46. Khatir H, Anouassi A, Tibary A. *In vitro* and *in vivo* developmental competence of dromedary (*Camelus dromedarius*) oocytes following *in vitro* fertilization or parthenogenetic activation. *Anim Reprod Sci.* julio de 2009;113(1–4):212–9.
47. Moulavi F, Hosseini SM. Effect of macromolecule supplement on nuclear and cytoplasmic maturation, cryosurvival and *in vitro* embryo development of dromedary camel oocytes. *Theriogenology* [Internet]. 2019;132:62–71. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.027>
48. Fathi M, Salama A, El-Shahat KH, EL-Sherbiny HR, Abdelnaby EA. Effect of melatonin supplementation during IVM of dromedary camel oocytes (*Camelus dromedarius*) on their maturation, fertilization, and developmental rates *in vitro*. *Theriogenology*. el 15 de septiembre de 2021;172:187–92.
49. Boeta M, Balcázar A, Cerbón JL, Hernández Medrano JH, Hernández Cerón J, Páramo Ramírez RM, et al. Fisiología reproductiva de los animales domésticos. Segunda edición. Mexico; 2023.
50. Zarco L. Fisiología reproductiva de los animales domésticos. Segunda edición. Rangel L, Hernandez Medrano JH, editores. Coyoacan - Mexico: Comité Editorial de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.; 2023. 71 p.
51. Jácome Aymara MAngel, Guamantario Tuba MPriscila. Evaluación de producción *in vitro* de embriones (*Bos taurus*) en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi. [Latacunga-Ecuador]: Universidad Técnica de Cotopaxi; 2014.
52. Tovío N, Sc M, Duica A, Grajales H. Desarrollo embrionario y estrategias antiluteolíticas hormonales en programas de transplante de embriones bovinos. Vol. 13, Rev.MVZ Córdoba. 2008.
53. Hurtado de Mendoza V, Arroyo G, Pons C, Cuadros J, Prados F. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos [Internet]. Madrid; 2015. Disponible en: www.gobalo.es



54. Velasquez Ordenes AE. Evaluacion de la capacidad predictiva de los marcadores de pluripotencia en embriones bovinos bipartidos sobre el potencial de desarrollo embrionario peri-implantatorio. 2016.
55. Borja Jimenez P. Revisión de la evolución de los Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 2021.
56. Gibbons A, Cueto M. Manual de transferencia de embriones en ovinos y caprinos. 2013.
57. Asurza Olaechea H. Glosario básico de términos estadísticos. INEI, editor. Lima Peru; 2006 may.
58. Arroyo-Ledezma J, De La Torre-Barrera J, Ávila-Serrano NY. Reproductive Response in Hair Sheep Synchronized with Progesterone or Prostaglandins. *Agrociencia*. 2013;47(7):661–70.
59. Fernandez A, Thais D, Muñoz G. produccion *in vitro* de embriones bovinos. *Rev Fac Cs Vets*. 2007;48(1):51–60.
60. Franco J, Uribe Velásquez LF. Hormona reproductivas de importancia veterinaria en hembras domésticas rumiantes. 2012;11(1):41–56.
61. Bernal CA. Metodología de la investigación administración, economía, humanidades y ciencias sociales. Tercera edicion. Fernanez Palma O, editor. Vol. Tercera edicion. Bogota-Colombia; 2010. 145–146 p.
62. Ruiz Huaraz CB, Valenzuela Ramos MR. Metodología de la investigación. Metodología de la investigación. 2022;
63. Supo J. Seminarios de Investigación Científica: Metodología de la Investigación para Las Ciencias de la Salud. En: CreateSpace Independent Publishing Platform 2012, editor. 2014.
64. Hernández Sampieri R, Fernández Collado C, María del Pilar Baptista Lucio D, Méndez Valencia Christian Paulina Mendoza Torres S. Metodología de la investigación. Sexta edición. Mexico; 2014.
65. RAE. Diccionario de la lengua española | Edición del Tricentenario | RAE - ASALE [Internet]. 2024 [citado el 14 de julio de 2024]. Disponible en: <https://dle.rae.es/>
66. Hawk HW, Wall RJ. Improved yields of bovine blastoysts from *in vitro*-produced oocytes. I. selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology* 41:1571-1583, 1994. 1994;1571–83.
67. Balzarini M, Gonzalez LA, Tablada M. Infostat: manual del usuario [Internet]. 2008. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/283491340>
68. Murray R S, Larry J S. Estadística [Internet]. Cuarta edicion. McGraw-Hill, editor. Mexico; 2009 [citado el 26 de julio de 2024]. Disponible en:



- https://pubhtml5.com/skfd/ehri/Estadi%CC%81stica._Serie_Schaum-_4ta_edicio%CC%81n_-_Murray_R._Spiegel.pdf_%281%29/
69. Espezúa DG, Bobadilla RR, Quispe AQ, Hualla ET, Iquise AP. Evaluation of four times of maturation *in vitro* in alpaca oocytes on the rate of maturation and embryonic development. *Spermova*. 2022;12(1):8–13.
 70. Ruiz B. J, Landeo J. L, Artica F. M, Ratto F. M, Correa S. J. Activación química de ovocitos de alpaca vitrificados después de la maduración *in vitro*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2011;22(3):206–12.
 71. Laines arce IM, Contreras M, Olaguivel CA. Evaluacion de dos medios de cultivo en la produccion de embriones *in vitro* de alpacas (*Vicugna pacos*). *SPERNOVA* [Internet]. 2021 [citado el 25 de julio de 2024];11(1):46–52. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12955/2184>
 72. Palomino-Guerrera W, Contreras M, Olaguivel C. Effect of the supplementation of two capacitive agents in the fertilization medium for the *in vitro* production of embryos in alpacas (*Vicugna pacos*). *Spermova*. el 1 de agosto de 2020;10(1):32–7.
 73. Maxwell WM, de Graaf SP, Ghaoui REH, Evans G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 2007;64:13–38.
 74. Igarashi H, Takahashi T, Nagase S. Oocyte aging underlies female reproductive aging: biological mechanisms and therapeutic strategies. *Reprod Med Biol*. 2015;14(4):159–69.
 75. Arriaga C. I, Huanca L. W, Becerra G. JJ, García H. P, Terreros C. M, Ampuero B. A. Efecto de Temperatura y Tiempo de Almacenamiento de Ovarios de Alpacas sobre la Tasa de Maduración y División *in vitro* de Ovocitos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2014;25(4):477–86.
 76. Wang YS, Zhao X, Su JM, An ZX, Xiong XR, Wang LJ, et al. Lowering storage temperature during ovary transport is beneficial to the developmental competence of bovine oocytes used for somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci*. 2011;124(1–2):48–54.



ANEXO





Fig. 1. Ovarios en medio de lavado



Fig. 2. Ovario colectado del matadero.

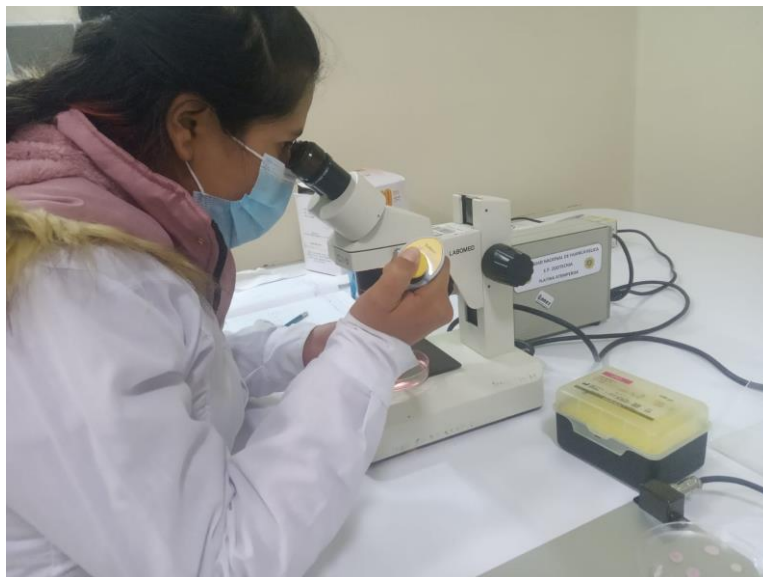


Fig. 3. Lavado de ovocitos, observado en estereomicroscopio.

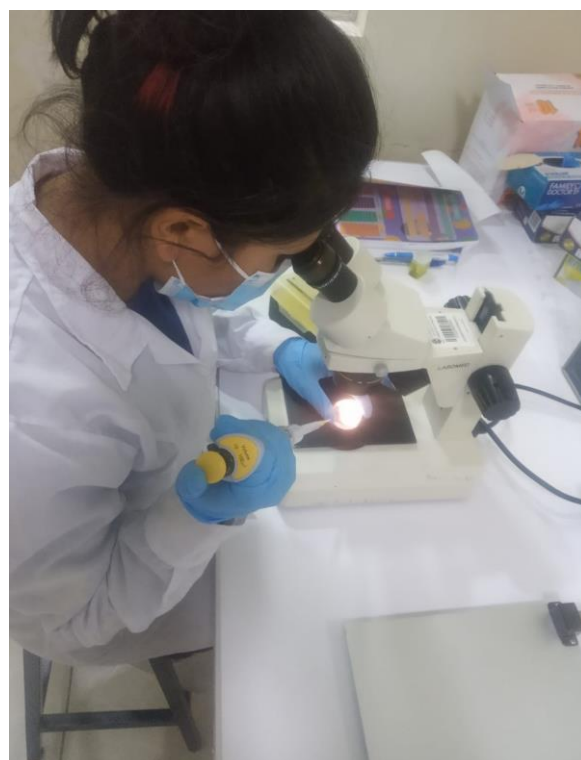


Fig. 4. Selección de ovocitos, observado bajo el estereomicroscopio.

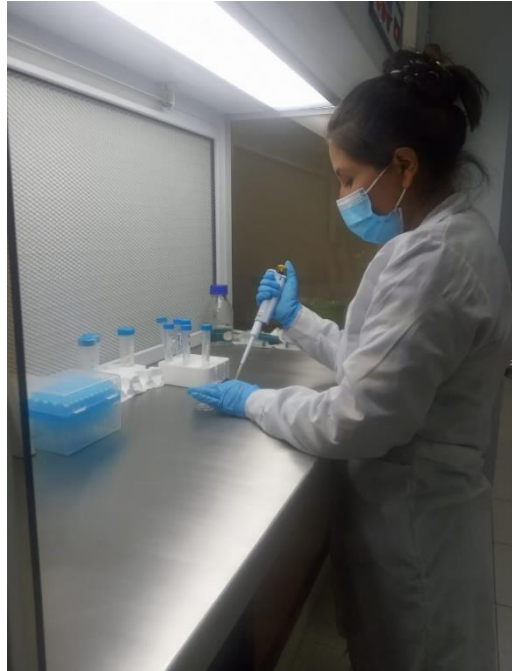


Fig. 5. Preparación de los medios de cultivo.



Fig. 6. Desarrollo embrionario, observado en el día 7.