

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad De Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN AL MEDIO DE MADURACIÓN IN
VITRO CON FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO TIPO I Y
SUERO DE ALPACA SUPEROVULADA SOBRE LAS TASAS
DE MADURACIÓN NUCLEAR DE OVOCITOS DE
ALPACAS (*Vicugna pacos*)**

TESIS

Presentada por:

Bach. ROSY BRASIL CASTRO CHAMBILLA

Para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

**TACNA – PERÚ
2024**

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN AL MEDIO DE MADURACIÓN IN VITRO CON FACTOR DE CRECIMIENTOS INSULÍNICO TIPO I Y SUERO DE ALPACA SUPEROVULADA SOBRE LAS TASAS DE MADURACIÓN NUCLEAR DE OVOCITOS DE ALPACAS (*Vicugna pacos*)”

Tesis sustentada y aprobada el 19 de enero del 2024, siendo el jurado calificador:

PRESIDENTE



MSc. CÉSARIO SEBASTIÁN CRUZ ANCHAPURI

SECRETARIO



MSc. CÉSARIO SEBASTIÁN CRUZ ANCHAPURI

VOCAL



MSc. DUANY CONDEMAYTA CUTIPA

ASESOR



Dr. DANIEL GANDARILLAS ESPEZÚA

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Daniel Gandarillas Espezúa en mi condición de asesor acreditado por la Resolución de facultad N° 5249-2018-FCAG de la tesis titulada "EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN AL MEDIO DE MADURACIÓN IN VITRO CON FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO TIPO I Y SUERO DE ALPACA SUPEROVULADA SOBRE LAS TASAS DE MADURACIÓN NUCLEAR DE OVOCITOS DE ALPACAS (*Vicugna pacos*)", presentada por Bachiller Rosy Brasil Castro Chambilla con el fin de obtener el título profesional de Médico Veterinario y Zootecnista.

Habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y de similitud de trabajo de investigación y producción intelectual, considerando que según la revisión, evaluación y análisis realizado a través del software de similitud textual TURNITIN, se consta que el nivel de similitud es del 10%, porcentaje que se encuentra dentro de los límites permitidos.

Por lo que, CERTIFICO LA SIMILARIDAD de la tesis enunciado líneas arriba, está expedita para continuar con los trámites para la obtención del título profesional y según corresponda consiguientemente la publicación en el repositorio institucional.


.....
Dr. Daniel Gandarillas Espezúa
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA
DNI 01771233


.....
Rosy Brasil Castro Chambilla
Tesis
DNI 46849389

DEDICATORIA

A mi abuelo, por todos sus esfuerzos y sacrificios por lograr que su descendencia no quede en la ignorancia y podamos servir a la sociedad.

A mi madre, por todos sus sacrificios para que yo logre subir un peldaño más que ella.

A mi hija, motivo suficiente para duplicar mis esfuerzos.

AGRADECIMIENTO

A mi madre por su apoyo incondicional durante mi formación como persona y profesional.

A mi asesor, el Dr. Daniel Gandarillas Espezúa, por sus enseñanzas y la oportunidad que me brindó de introducirme en el mundo de la investigación y lograr desarrollar este trabajo con su apoyo.

A mi maestra, Leandra Landeo, por sus enseñanzas, paciencia y gran apoyo en la realización de este trabajo.

Al Proyecto de investigación “Uso de biotecnología para el mejoramiento genético y desarrollo de capacidades en el manejo de alpacas en la zona alto andina de Tacna” por brindarme su apoyo para el desarrollo de esta tesis.

A Edith Torres, por compartir amable y desinteresadamente sus conocimientos y animarme a seguir adelante aun en los peores momentos.

A todos mis amigos del proyecto de biotecnología reproductiva por su apoyo como familia.

CONTENIDO

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.1 Descripción del Problema.....	4
1.2 Justificación	5
1.3 Objetivos	7
1.3.1 Objetivo General.....	7
1.3.2 Objetivos Específicos	7
1.4 Hipótesis	8

1.4.1	Hipótesis nula: H_0	8
1.4.2	Hipótesis alternativa: H_a	8
CAPÍTULO II.....		9
MARCO TEÓRICO.....		9
2.1	Antecedentes.....	9
2.1.1	Nacional.....	9
2.1.2	Internacional.....	10
2.2	Bases teóricas.....	12
2.2.1	Descripción de la especie.....	12
2.2.2	Maduración del ovocito.....	12
2.2.3	Maduración in vitro.....	18
2.3	Marco conceptual.....	30
CAPÍTULO III.....		33
MATERIALES Y MÉTODOS.....		33
3.1	Material.....	33
3.1.1	Ubicación Geográfica y Temporal.....	33
3.1.2	Población y Muestra.....	33

3.1.3	Materiales	34
3.2	Método	36
3.2.1	Tipo y Diseño de Investigación.....	36
3.2.2	Diseño Procedimental.....	36
CAPÍTULO IV.....		43
RESULTADOS		43
4.1	Comparar el uso de Factor de Crecimiento Insulínico tipo I y Suero de Alpaca Superovulada en los medios de maduración in vitro sobre las tasas de maduración nuclear de ovocitos de alpacas (<i>Vicugna pacos</i>).	43
4.2	Evaluar la suplementación con Factor de Crecimiento Insulínico tipo I en los medios de maduración in vitro en reemplazo del Suero Fetal Bovino, sobre las tasas de maduración nuclear de ovocitos de alpacas (<i>Vicugna pacos</i>).	44
4.3	Evaluar la suplementación con Suero de Alpaca Superovulada en los medios de maduración in vitro en reemplazo del Suero Fetal Bovino sobre las tasas de	

maduración nuclear de ovocitos de alpacas (<i>Vicugna</i> <i>pacos</i>).....	46
CAPÍTULO V.....	48
DISCUSIÓN.....	48
5.1 Maduración con suero fetal bovino.....	48
5.2 Maduración con factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I).....	50
5.3 Maduración con suero de alpaca superovulada (SAS).....	51
5.4 Contrastación de hipótesis	51
CONCLUSIONES.....	53
RECOMENDACIONES.....	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de ovocitos madurados y lecturados según tratamiento	34
Tabla 2. Medio TCM-199 Stock según cantidad	39
Tabla 3. Medio IVM por concentración y volumen	39
Tabla 4. Tasa de maduración nuclear de ovocitos de alpaca sometidos a diferentes suplementos (Suero Fetal Bovino, Factor de Crecimiento Insulínico Tipo I y Suero de Alpaca Superovulada).....	43
Tabla 5. Fase de maduración nuclear de ovocitos de alpaca sometido a Factor de Crecimiento Insulínico tipo I (IGF-I)	45
Tabla 6. Fase de maduración nuclear de ovocitos de alpaca sometido a Suero de Alpaca Superovulada (SAS)	46

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Número de ovocitos en fases de maduración nuclear por tratamiento.....	64
Anexo 2. Registro de muestras	65
Anexo 3. Registro de lectura de ovocitos sometidos a maduración nuclear	66
Anexo 4. Ovocito de alpaca en estadio de Anafase I con los cromosomas desplazándose hacia los polos del huso acromático (flecha azul). Tinción con orceína acética al 1%. Microscopio óptico objetivo 40x.	67

RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNJBG-Tacna. El estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF – I) y suero de alpaca superovulada (SAS) sobre la tasa de maduración nuclear de ovocitos de alpacas (*Vicugna pacos*). Se colectaron 490 ovarios de alpacas que fueron beneficiadas en el camal de la localidad de Mazocruz, aspirándose un total de 1 456 ovocitos y seleccionándose 1 036 ovocitos de calidad I y II. Los ovocitos seleccionados fueron madurados durante 26 horas en medio TCM – 199 suplementado con HEPES 25mM, piruvato de sodio 0,2mM, sulfato de gentamicina 50µg/ml, FSH 0,02unidades /ml, Estradiol 17-β 1µg/ml, luego se formaron 3 grupos: para el grupo control, suero fetal bovino al 10%, para el segundo grupo, 10ng/ml IGF – I y para el tercer grupo suero de alpaca superovulada. Los resultados fueron para el grupo control un 35,78% de ovocitos en metafase II, 36,11% para el segundo grupo y 25,74% para el tercer grupo. En conclusión, el suero de alpaca superovulada y factor de crecimiento insulínico tipo I tienen el mismo efecto que el suero fetal bovino sobre las tasas de maduración nuclear.

Palabras clave: alpaca, factor crecimiento insulínico, maduración, ovocitos, suero, superovulada.

ABSTRACT

The research work was carried out in the Animal Reproduction Laboratory of the Professional School of Veterinary Medicine and Zootechnics of the UNJBG-Tacna. The objective of the study was to evaluate the effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) and superovulated alpaca serum (SAS) on the nuclear maturation rate of alpaca oocytes (*Vicugna pacos*). 490 ovaries were collected from alpacas that were processed in the slaughterhouse in the town of Mazocruz, a total of 1 456 oocytes were aspirated and 1 036 oocytes of quality I and II were selected. The selected oocytes were matured for 26 hours in TCM-199 medium supplemented with 25mM HEPES, 0,2mM sodium pyruvate, 50µg/ml gentamicin sulfate, 0,02units/ml FSH, 1µg/ml Estradiol 17-β. ml, then 3 groups were formed: for the control group, 10% fetal bovine serum, for the second group, 10ng/ml IGF – I and for the third group superovulated alpaca serum. The results were 35,78% of oocytes in metaphase II for the control group, 36,11% for the second group and 25,74% for the third group. In conclusion, superovulated alpaca serum and insulin-like growth factor I have the same effect as fetal bovine serum on nuclear maturation rates.

Keywords: alpaca, insulin growth factor maturation, oocytes, serum, superovulated.

INTRODUCCIÓN

En el Perú, la explotación de camélidos sudamericanos presenta deficiencias en su esquema tradicional de crianza, existiendo cruzamientos no programados que repercute en la calidad genética de éstos, con altas tasas de morbilidad, mortalidad y baja eficiencia reproductiva (Freyre, 2006; Apaza et al., 2001).

La aplicación de biotecnologías reproductivas como transferencia de embriones producidos in vitro pueden ayudar a superar los bajos índices reproductivos, acelerando la multiplicación de animales de alto valor genético, sin embargo, dichas biotecnologías aún se encuentran en desarrollo en estas especies sin poder ser aplicada de manera masiva, habiendo escasos reportes de fertilización in vitro debido a que este se encuentra sujeto a la maduración in vitro de ovocitos (Ruiz, 2015).

Los primeros estudios sobre maduración y fertilización in vitro en camélidos sudamericanos fueron realizados en llamas, evaluándose medios y tiempos de maduración; también existen reducidos trabajos de maduración in vitro de ovocitos de vicuña y alpaca, sin lograrse hasta el momento nacimientos de embriones producidos in vitro (Ratto et al., 2005; Ruiz & Correa, 2007; Ruiz, 2015).

Por ello, se continúa desarrollando mejoras en los protocolos de maduración in vitro en alpacas, proponiendo e implementándose el uso de suplementos que puedan contribuir a obtener mejores resultados, como por ejemplo el uso de factores de crecimiento, siendo probados el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-1) y factor de crecimiento epidermal (EGF) en medios de maduración in vitro de ovocitos bovinos, reemplazando el uso de suero fetal bovino, obteniéndose una tasa de maduración nuclear de hasta 61,4%, demostrándose, además, que ambos factores solos o juntos tienen el mismo efecto sobre las tasas de maduración nuclear. Así mismo, el uso de factores de crecimiento, pero en compañía de suero fetal bovino, fue reportado en maduración de ovocitos de llama, lográndose una tasa de maduración de 74% (Lorenzo et al., 1994; Sansinena et al., 2007).

Se conoce también el uso de sueros alternativos como el suero de ovino superovulado en medios de maduración in vitro de ovocitos ovinos, lográndose una tasa de maduración de 95,51%, sin embargo, en camélidos sudamericanos aún no se han registrado datos sobre el uso de algún suero alternativo como el mencionado (Chavez, 2017).

En consecuencia, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de dos suplementos (factor de crecimiento insulínico tipo I y suero de

alpaca superovulada) sobre las tasas de maduración nuclear de ovocitos en medios de maduración in vitro, proponiéndose por primera vez el uso de suero de alpaca superovulada, aportando alternativas en la suplementación de medios in vitro para mejoras en los métodos de maduración in vitro y en consecuencia la fertilización in vitro, siendo así más factible la aplicación de las biotecnologías reproductivas.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción del Problema

En camélidos, la posibilidad de mejora genética de los rebaños de productores mediante la prueba de progenie, con la formación de núcleos de reproductores, requiere años de trabajo y está limitada, entre otros factores, por el largo intervalo generacional y la capacidad fisiológica de una hembra que sólo puede tener hasta 4 crías durante toda su vida reproductiva (Novoa et al., 1999).

La aplicación de biotecnologías reproductivas como la transferencia de embriones por fertilización in vitro en alpacas representa una opción para acelerar el mejoramiento genético en alpacas y para la preservación de las especies silvestres, debido a que potencializa el uso de ovocitos producidos por un ovario mediante la técnica de maduración in vitro, obteniendo así un mayor número de embriones por hembra. Sin embargo, estas biotecnologías en camélidos sudamericanos se encuentran en estado formativo, existiendo pocos reportes de fertilización in vitro por ser un evento que está supeditado a la eficiente maduración del ovocito.

En alpacas la maduración in vitro de ovocitos es similar a la de los vacunos, pero los resultados sobre las tasas de maduración difieren entre ambas especies, reportándose tasas de maduración de 56,25% a 83% en vacunos y para alpacas una tasa menor y muy variable que va entre 18,9% y 42,9% (Huanca et al., 2009).

Si bien con la transferencia de embriones producidos por fertilización in vitro se han reportado gestaciones tempranas en alpacas y llamas, sólo ha habido un único nacimiento de llama en Huancavelica y ninguno en alpacas, siendo un indicativo de que aún se necesitan mayores estudios que permitan optimizar y estandarizar protocolos de maduración in vitro para lograr mejoras en la fertilización in vitro y así obtener mayores tasas de gestación y natalidad (Ruiz, 2015).

1.2 Justificación

En el Perú la explotación de estas especies se realiza mediante métodos tradicionales que no son siempre eficientes, presentando elevadas tasas de morbilidad y mortalidad, así como una baja eficacia en la reproducción. Las tasas de natalidad anual en la mayoría de explotaciones alpaqueras son del 50%, con índices de fertilidad y preñez inferiores a 65% y 60% respectivamente (Apaza et al., 2001).

La aplicación de biotecnologías reproductivas como la transferencia de embriones podrían contribuir a superar estos bajos índices reproductivos acelerando la multiplicación de animales de alto valor genético. Sin embargo, la aplicación de las biotecnologías reproductivas en estas especies se encuentra en desarrollo y no se aplican en forma masiva, siendo los porcentajes de maduración in vitro de ovocitos en alpacas reportados a la fecha del 42,9%, obteniéndose un bajo número de ovocitos aptos para una posterior fertilización in vitro, por lo tanto, menores posibilidades de lograrse un embrión in vitro. Por ello es que se propone el uso de factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-1) y suero de alpaca superovulada (SAS) como alternativas de suplementos en medios de maduración in vitro, habiéndose demostrado ya que, en medios de maduración de ovocitos bovinos, IGF-1, solo o junto a otro factor de crecimiento y en reemplazo de suero fetal bovino (SFB), mejora las tasas de maduración in vitro lográndose una tasa de hasta 61,4% frente a un 35,6% obtenido de medios con suero fetal bovino, así también, se reportó el uso de suero de ovino superovulado, también con efectos positivos en ovocitos de ovino, lográndose una tasa de maduración de 95,51% (Ruiz, 2015; Lorenzo et al., 1994; Chavez, 2017).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Comparar el uso de Factor de Crecimiento Insulínico tipo I y Suero de Alpaca Superovulada en los medios de maduración in vitro sobre las tasas de maduración nuclear de ovocitos de alpacas (*Vicugna pacos*).

1.3.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la suplementación con Factor de Crecimiento Insulínico tipo I en los medios de maduración in vitro en reemplazo del Suero Fetal Bovino, sobre las tasas de maduración nuclear de ovocitos de alpacas (*Vicugna pacos*).
- Evaluar la suplementación con Suero de Alpaca Superovulada en los medios de maduración in vitro en reemplazo del Suero Fetal Bovino sobre las tasas de maduración nuclear de ovocitos de alpacas (*Vicugna pacos*).

1.4 Hipótesis

1.4.1 Hipótesis nula: Ho

La tasa de maduración nuclear de ovocitos resulta ser similar con factor de crecimiento insulínico tipo I y suero de alpaca superovulada en medios de maduración in vitro.

1.4.2 Hipótesis alternativa: Ha

La tasa maduración nuclear de ovocitos resulta ser mejor con factor de crecimiento insulínico tipo I y suero de alpaca superovulada en medios de maduración in vitro.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Los reportes sobre maduración in vitro de ovocitos de alpacas son escasos, habiendo más estudios realizados en llamas, en donde se evalúan los medios y los tiempos de maduración, obteniéndose una tasa de maduración de ovocitos entre el 30% y 100%, siendo muy variables estos resultados y que generan dificultades en la fertilización in vitro, indicándonos que aún se necesitan mayores estudios que permitan estandarizar y optimizar protocolos de maduración in vitro (Ruiz, 2015).

2.1.1 Nacional

Ruiz & Correa (2007) sometieron a procesos de maduración in vitro ovocitos de alpaca y llama obtenidos mediante aspiración laparoscópica, en medio TCM-199 suplementado con piruvato de Na (0,2mM), sulfato de gentamicina (50µg/mL), FSH (0,02unidades/ml), estradiol (17-β 1µg/ml) y suero fetal bovino al 10%, utilizando tiempos de 27 y 30 horas respectivamente, obtuvieron 75% y 100% de ovocitos en Metafase II de llama y alpaca.

Sansinema et al. (2007) reportaron el uso de factores de crecimiento en el medio de maduración de ovocitos de llama, siendo este medio a base de TCM-199 suplementado con 5 µg/ml de FSH, 10µg/ml de LH, 10ng/ml de EGF, 10ng/ml de IGF-1 y 1µg/ml de estradiol 17b y 10% de suero fetal bovino, obteniendo un 74% de ovocitos en Metafase II luego de 30 horas de maduración in vitro.

Landeo et al. (2016) obtuvieron una mayor tasa de maduración de ovocitos de alpaca a las 42 horas, frente a 26, 30, 34, y 38 horas, pero al ser fecundados los ovocitos maduros con los mismos tiempos de maduración in vitro se obtuvo una mayor tasa de blastocistos a las 26 horas y una menor tasa a las 42 horas de maduración in vitro.

Chávez (2017) reportó una tasa de maduración de ovocitos de oveja de 94,34% utilizando suero de oveja superovulada, con respecto al uso de suero de alpaca superovulada en medios de maduración in vitro aún no se han presentado reportes a la fecha.

2.1.2 Internacional

Del Campo et al. (1992) realizaron la primera Maduración In Vitro (MIV) en llamas, empleando un periodo de 36 horas en TCM-199 complementado con suero fetal bovino, piruvato de sodio, FSH, estradiol y sulfato de gentamicina, logrando un 62% de ovocitos que alcanzaron la fase de

Metafase II (MII). En otro estudio, Del Campo et al. (1994) obtuvieron un 30% de ovocitos en MII después de 30 horas de MIV. La diferencia entre un experimento y otro estuvo en que se utilizaron distintos protocolos de recuperación de complejo ovocito – cúmulo (COCs), en la primera situación se extrajeron los folículos ováricos mediante el uso de una jeringa, mientras que en la segunda situación los ovarios fueron cortados utilizando una hoja de afeitar.

Ratto et al. (2005) utilizando un medio de maduración similar al que usaron Del campo et al. (1992, 1994), en donde se usa como fuente de proteína el suero fetal bovino, encontraron 77,7%, 80,6% y 80,4% de ovocitos en MII cuando utilizaron 28, 30 y 36 horas de maduración in vitro de ovocitos de llama sin diferencias estadísticas entre los 3 tiempos evaluados.

Con respecto al uso de los factores de crecimiento en la maduración in vitro ya fueron descritos en otras especies como el bovino, pero en camélidos sudamericanos, más específicamente alpacas, aún no se han presentado reportes. Lorenzo et al. (1994), trabajaron en su medio de maduración de ovocitos bovinos con los factores de crecimiento EGF e IGF-I, con ausencia de suero y gonadotropinas, formando tres grupos evaluando EGF e IGF-I de manera individual y en conjunto, obteniendo resultados del 52,1% para

EGF, 49,5% para IGF-I y 61,4% para EGF + IGF-I, concluyendo que ambos factores de crecimientos en conjunto o solos mejoran la maduración en ovocitos rodeados de cúmulos compactos.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Descripción de la especie

La alpaca es un camélido sudamericano doméstico de menor tamaño que la llama, posee un cuello largo y cabeza pequeña. Desde su domesticación, la cría de alpacas se realizó en los valles interandinos desde hace 3 800 años y se ha ubicado en esta zona debido a las particulares funciones anatomo-fisiológicas que presentan para la deshidratación y la hipoxia (Aller, 2015).

La alpaca es empleada como productora de fibra y carne. La carne de llama y alpaca es casi la única fuente de proteína animal disponible en los habitantes de la Puna (Aller, 2015).

2.2.2 Maduración del ovocito

Ovarios

El ovario es el órgano femenino cuya función es la reproducción mediante la producción de hormonas que afectan a este órgano como a otros del cuerpo, además de generar células germinales. Es de forma irregular con

medidas en promedio de 1,3-2,5 x 1,4-2,5 x 0,5-1,0cm, presentando pequeños folículos de 1 a 3mm de diámetro, en cuyo interior se da el proceso de maduración del ovocito (Aller, 2015).

Ovogénesis

Los folículos se encuentran en la región cortical del ovario constituyendo la unidad funcional por excelencia de este último, están presentes en estadio de folículos primordiales, sin signos aparentes de diferenciación, o con folículos en la fase de reclutamiento o maduración (Mehlmann et al., 2002).

Los ovarios se forman durante el desarrollo embrionario, teniendo lugar en el endodermo del saco vitelino a partir de células germinales primordiales que emigran hasta la cresta gonadal antes de diferenciarse en ovocitos; durante el desarrollo fetal las células germinales primordiales del ovario van a sufrir un proceso de diferenciación; inicialmente se transforman en ovogonias por sucesivas divisiones mitóticas, las cuales dan lugar a ovocitos primarios al iniciarse la primera división mitótica (Mehlmann et al., 2002). En las hembras, toda la población de ovocitos entra en meiosis sincrónicamente en la vida fetal. Justo antes o poco después del nacimiento se produce la primera detención de la meiosis en el estadio de diploteno de la profase I (estadio dictiatio), en este momento, el ovocito comienza a ser

rodeado por células granulosas que forman una membrana basal alrededor de las mismas, generando el comportamiento folicular (Mehlmann, 2005). La primera parada de la meiosis se mantiene hasta momentos antes de la ovulación o de la atresia folicular, y es necesario para asegurar que el ovocito disponga de tiempo suficiente para crecer antes de la fecundación (Van de Wiel et al., 1983).

La latencia del ovocito en estadio de diploteno de la profase I se mantiene debido a un sistema de control múltiple en el que están implicados factores como el adenosín monofosfato cíclico (AMPC), la hipoxantina y el factor inhibidor de la maduración de ovocitos, cuya finalidad es mantener inactivo al factor promotor de la maduración/meiosis (MPF) (Kalinowski et al., 2004). Los ovocitos en estado latente en la profase I, presentan un núcleo prominente denominado vesícula germinal (VG) y están rodeados de una capa de células epiteliales (foliculares) no proliferativas conocidas como células pregranulosas, que están implicadas en el crecimiento folicular y en el mantenimiento de la inhibición de la meiosis del ovocito; el conjunto del ovocito primordial y la capa de células de la granulosa que lo rodean forman una unidad funcional denominada folículo primordial (Gougeon, 1996). Al nacimiento los ovocitos alcanzan este estado dando origen a los folículos primordiales.

Meiosis

El proceso de maduración del núcleo del ovocito tiene como fin lograr una célula haploide reduciendo la carga cromosómica de la especie a la mitad. Al comienzo de la maduración, se observa el estadio de vesícula germinal (GV) del núcleo del ovocito primario, el mismo que se halla detenido en la profase de diploteno de la primera división meiótica. Como respuesta a la elevación preovulatoria de la LH en la madurez del folículo, el ovocito reinicia la división meiótica, el núcleo entra en diacinesis, y al término de la profase I la envoltura nuclear se esparce ocurriendo la ruptura de la vesícula germinal. A la vez acontece una polimerización de los microtúbulos, se disipan los nucléolos y los cromosomas se condensan orientándose de manera que forman el huso acromático correspondiente a la metafase I, luego, se desglosan los cromosomas homólogos, se produce la expulsión del primer cuerpo polar, dando origen al ovocito secundario con un solo par de cromosomas; contrario de la profase I, que es extensa, la profase II, prácticamente no existe, accediendo inmediatamente a la metafase II, comenzando así la segunda división meiótica que se detiene nuevamente (segundo bloqueo) y el ovocito es expulsado del ovario durante la ovulación; la segunda división meiótica termina cuando el ovocito

es penetrado por un espermatozoide y se produce la extrusión del segundo corpúsculo polar (Huanca et al., 2014).

Endocrinología del desarrollo folicular

Diversos agentes endocrinos se encuentran implicados en el desarrollo de los folículos ováricos y la maduración de los ovocitos, siendo las principales las gonadotropinas, como la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH); la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) producida en el hipotálamo provoca la liberación de la FSH por parte de la glándula pituitaria anterior, permitiendo la división celular de la capa de granulosa y formación de la cavidad antral, además de estimular la expresión de receptores para la LH, la cual permite la liberación del ovocito. Cuando el folículo se va diferenciando, las concentraciones de FSH disminuyen debido a la producción de inhibina por parte del folículo que está en proceso de maduración; la alta producción de inhibina producida por el folículo dominante actúa localmente inhibiendo el desarrollo de los folículos subordinados y en forma sistémica, por un mecanismo de retroalimentación negativo a la FSH a nivel de la hipófisis (Donadeu & Ginther, 2002).

La tarea de la hormona luteinizante (LH) consiste en iniciar de nuevo la meiosis en el folículo preovulatorio, desencadenar la ovulación y regular el desarrollo y la persistencia del cuerpo lúteo (CL); ejerce su acción uniéndose a receptores presentes en las células de la granulosa y células de la teca del folículo preovulatorio (Giggli et al., 2006). La expresión de los receptores para LH (LHr) es detectado en las células de la granulosa de folículos de 8 mm y aumenta a medida que el folículo también desarrolla; no se ha encontrado LHr en folículos menores de 8 mm o subordinados debido a que el folículo en desarrollo es dependiente de FSH y cuenta con receptores para FSH (FSHr), quien durante su desarrollo va adquiriendo dependencia por LH por lo que se expresa los LHr (Giggli et al., 2006).

Se han identificado otros elementos que afectan la calidad del ovocito, como el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), cuya estructura se asemeja a la insulina y es generado por las células de la granulosa. Este factor está compuesto por dos ligandos: IGF-1 e IGF-2, específicamente, el IGF-1 tiene la función de promover la proliferación de las células de la granulosa y la producción de estradiol, actuando como un inhibidor de la apoptosis en las células de la granulosa en folículos antrales tempranos y preovulatorios; además, el IGF-1 incrementa la sensibilidad de las células de la granulosa hacia la FSH, lo que resulta en un aumento de la secreción

de inhibina-A, activina-A y folistatina, además de intensificar la estimulación del LH y provocar la síntesis de andrógenos por parte de las células de la teca; por último, se sabe que existen 6 proteínas que regulan la acción de las IGF, las cuales tienen un rol competitivo sobre los receptores de los IGF (Gigli et al., 2006).

Las hormonas como el estradiol, la progesterona y la prolactina han sido consideradas como indicadores potenciales de la calidad del ovocito, destacando la importancia del estradiol. La síntesis del estradiol comienza con el colesterol, que se convierte en androstenediona y luego en estradiol a través de la enzima aromatasa en un proceso llamado aromatización, que ocurre en las células de la granulosa. Cualquier disfunción en este sistema podría afectar la producción de estradiol y tener consecuencias en la salud de los ovocitos. Es así que la aromatización y las concentraciones de estrógenos son fundamentales para la madurez ovocitaria y aquellos que pueden convertir más andrógenos a estradiol son los más saludables (Andersen, 1993).

2.2.3 Maduración in vitro

El cultivo de ovocitos en entorno controlado es una técnica empleada en los últimos años con el propósito principal de lograr ovocitos adecuados

para la fertilización posterior. La maduración del ovocito se divide en maduración nuclear y citoplasmática. El ovocito maduro a nivel nuclear puede ser claramente identificado como aquel que reanuda la meiosis y alcanza el estadio de MII; mientras que la maduración citoplasmática, término que abarca una serie de acontecimientos no directamente relacionados con la progresión de la meiosis pero que van a preparar al ovocito para la fertilización (Abeydeera, 2002). Durante la maduración in vivo de los ovocitos, participan la hormona folículo estimulante (FSH) en el desarrollo folicular, la hormona luteinizante (LH), que provoca la maduración final y la ovulación del ovocito seleccionado; varios autores han indicado que para que el proceso de maduración se lleve a cabo debe existir un balance hormonal en el folículo (particularmente de los esteroides); en un sistema in vitro, este balance natural es imitado agregando las hormonas FSH y estradiol 17 β al medio de maduración (TCM-199); en algunos laboratorios la adición directa de estas hormonas ha sido substituida agregando suero de vacas en celo (SVC) y licor folicular bovino (LFB); estos componentes biológicos son suficientes para producir maduración (nuclear y citoplasmática), expansión de las células del cúmulo y futuro desarrollo del cigoto (Filipiak et al., 2010).

Obtención y transporte de los ovarios

Los ovarios que son colectados para este tipo de procedimientos provienen de animales que han sido sacrificados para abasto público; se toma de hembras vacías en edad reproductiva, a dos horas post –beneficio, inmediatamente se identifican y colocan en una caja térmica que contiene solución salina 0,9% (NaCL) + antibiótico antimicótico, a 37°C, y se transportan al laboratorio dentro de las 8 a 10 horas siguientes (Huanca et al., 2014).

Recuperación de ovocitos

Para obtener los ovocitos, se desarrollaron dos técnicas: la técnica de aspiración y la técnica de corte. La técnica de aspiración consiste en la succión de los folículos localizados en la superficie del ovario mediante una aguja; la dimensión de la aguja utilizada se considera crucial para evitar dañar los ovocitos recolectados, se emplea una jeringa de 10mL con una aguja de 21G x 1½ pulgadas o una jeringa de 10mL estéril con aguja 18G x 1½, y luego se colocan en un medio de lavado; la técnica de slicing folicular (incisión de la superficie del folículo del ovario) los ovarios son fijados a una pieza hemostática curva para luego, utilizar un bisturí, seccionar longitudinal y transversalmente todos los folículos visibles de 2 a 6mm; por otra parte, aunque la recuperación de ovocitos por disección de

los folículos es más laboriosa que por aspiración, asegura la recuperación de ovocitos exclusivamente de folículos no atrésicos; del mismo modo, es superior la proporción de ovocitos considerados como aptos para ser cultivados in vitro, mediante la utilización de la técnica de corte (Hamano & Kuwayama, 1993).

Selección de ovocitos

Se consideran tres criterios para la selección de ovocitos los cuales son: el diámetro de ovocitos, la apariencia del citoplasma y las características del cúmulo que los circunda. Estudios han demostrado que la calidad del complejo cúmulo ovocito (COCs) tiene una implicancia directa sobre el potencial de maduración de los ovocitos; además la calidad de los ovocitos se estima al evaluar el número de capas de células que lo rodean y la morfología del citoplasma (Seneda et al., 2001). La calidad de los ovocitos se estima regularmente luego de evaluar el número de capas de células que lo rodean y la morfología del citoplasma; además, los ovocitos pueden ser categorizados de acuerdo al número de capas de células del cúmulo y la apariencia del citoplasma (Seneda et al., 2001). De estas categorías en general se considera que solamente los ovocitos de categorías I y II poseen un elevado potencial para desarrollarse a embriones por fertilización in vitro en comparación a las categorías III y IV (Lonergan et al., 1994).

Los ovocitos se clasifican en:

- Ovocitos categoría I: (excelentes) presentan citoplasma oscuro uniforme combinado con 5 o más capas compactas del cúmulus (Ratto et al. 2005).
- Ovocitos categoría II: (buenos) presentan citoplasma oscuro uniforme conjuntamente con una corona radiada completa pero menos de 5 capas del cúmulus (Ratto et al. 2005).
- Ovocitos categoría III: (regulares) presentan una pérdida de la uniformidad del citoplasma, la corona radiada se presenta incompleta y las capas del cúmulus presentes son menos compactas (Ratto et al. 2005).
- Ovocitos categoría IV: (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 (Ratto et al. 2005).

Medios de maduración

Para la maduración in vitro de los ovocitos se utilizan diferentes medios de cultivo Ham's F-10 y Ham's F-12, Krebs Ringer Bicarbonato modificado, TCM-199, MEM, Tyrodes y Waymouth MB752/1; todos ellos, presentan en su composición una mezcla de sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, glucosa, piruvato de sodio, hipoxantina, timidina y rojo fenol como

indicador, en dichos medios, los componentes varían en diferentes proporciones de sus componentes; a pesar de la amplia variedad de ellos descrita, el más utilizado es el TCM- 199 (Gliedt et al., 1996).

Suplementación de los medios de maduración

El medio de maduración de los ovocitos, se enriquece con suero fetal bovino (SFB), suero de vaca en celo (SVC) o albumina sérica bovina (BSA); estos elementos, favorecen la expansión de las células del cúmulo y la producción de diversos factores que promueven el reinicio de la meiosis granulosa (Lee et al., 1996).

Otros suplementos utilizados en diferentes concentraciones, son los factores de crecimiento (EGF, IGF-I, IGF-II, TGF, TGF y activina). Estos, son elementos que favorecen la maduración de los ovocitos y actúan como agentes mitogénicos sobre las células de la granulosa (Lee et al., 1996).

Las hormonas FSH y LH juegan un papel crucial tanto en los procesos de maduración in vivo como en la maduración in vitro. También se presentan; estrógenos, progesterona y HCG, que son diferentes suplementos comúnmente utilizados en los medios de cultivo y tienen acción positiva en la maduración in vitro de ovocitos (Leibfried & First, 1979; Xu, et al., 1986).

La adición de LH y IGF-I al medio de maduración, también favorece el desarrollo de los futuros embriones (Harper & Brackett, 1992a; Harper & Brackett, 1992b).

- **Factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF – I)**

Las gonadotropinas son los principales reguladores de la maduración nuclear en ovocitos de mamíferos in vivo. Sin embargo, la gonadotropina es solo uno de una secuencia compleja de factores, como los factores de crecimiento, que parecen regular la función ovárica. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) estimula la proliferación de células de la granulosa ovárica in vitro en varias especies, modula la diferenciación de las células de la granulosa y estimula el crecimiento de pequeños folículos en las mujeres. Parece que EGF, como LH, promueve la maduración de los ovocitos al interrumpir su comunicación con las células del cúmulo o que crea una señal de maduración positiva (Lorenzo et al., 1994).

El factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) es un potente mitógeno para las células de la granulosa, incluso en ausencia de FSH, y actúa como un amplificador biológico de la acción de FSH en el ovario (Lorenzo et al., 1994).

También es factible que EGF más IGF-I interactúe con gonadotropinas, esteroides u otras moléculas para regular el desarrollo folicular de los ovocitos in vivo. En conclusión, EGF, ya sea solo o en conjunto con IGF-I, estimula la expansión del cúmulo. La adición de EGF, IGF-I o ambos factores mejoró la maduración nuclear en ovocitos de bovino inmaduros in vitro y este efecto está mediado por la presencia de células de cúmulo (Lorenzo et al., 1994).

- **Suero de alpaca superovulada**

El suero es la fracción líquida de la sangre coagulada, sin células, fibrina o factores de coagulación, pero que contiene un gran número de factores macromoleculares y nutricionales esenciales para el crecimiento celular; también son de gran importancia el gran número de factores de crecimiento contenidos, por ejemplo, en el suero fetal bovino, los cuales son esenciales para el mantenimiento y crecimiento de células en cultivo; en caso de sueros obtenidos de animales en estro aún no se tienen datos precisos sobre dichos factores; el suero, a su vez posee sustancias que podrían afectar al desarrollo celular, por ello, un tratamiento común para el suero es la inactivación por calor, en el cual éste se calienta a 56°C por 30 minutos en baño María, inactivando de esta manera el sistema del complemento, y

potenciales inhibidores de crecimiento celular desconocidos (Palasz et al., 1995).

Por otra parte, en camélidos, los procesos de superestimulación han sido llevados a cabo utilizando Gonadotropina Coriónica equina (eCG) y Hormona Folículo Estimulante (FSH) durante la fase luteal, la cual es inducida con GnRH o hCG, o generando una fase luteal artificial a través del empleo de progestágenos; el uso de dichas hormonas superestimuladoras probablemente mejoren los niveles séricos de hormonas como el estradiol, FSH y LH en animales sometidos a este tratamiento, por tal motivo podrían mejorar la calidad del suero obtenido para su posterior uso en maduración in vitro de ovocitos. Lamentablemente no existen reportes sobre valores séricos de dichas hormonas en animales superovulados, por lo que el suero a utilizar en el presente proyecto fue mandado a analizar para obtener datos más exactos sobre su composición con respecto a hormonas reproductivas y factores de crecimiento (Ratto et al., 2015).

Estadío nuclear y citoplasmático del ovocito

El ovocito inmaduro presenta una morfología, definida y característica, que sufrirá importantes cambios a lo largo del proceso de maduración. Dichos

cambios morfológicos se demuestran utilizando técnicas de tinción por microscopía óptica o electrónica (Xu et al., 1986; Hyttel et al., 1986; De Loos et al., 1992).

- **Morfología del ovocito inmaduro**

El ovocito, cuando está separado de su folículo, presenta un núcleo grande posicionado en la periferia, bordeado por una membrana nuclear y con un nucléolo poco visible, correspondiendo a la etapa de Vesícula Germinal (GV). Los orgánulos citoplasmáticos se distribuyen por todo el citoplasma, con mitocondrias en la periferia y gránulos corticales, Retículo Endoplasmático rugoso (REr), aparato de Golgi y vesículas lisosomales en posición central. El espacio perivitelino es mínimo o inexistente, y la zona pelúcida está atravesada por prolongaciones de las células de la corona radiada, formando uniones intercelulares (gap junctions); estas uniones conectan incluso el interior del ovocito con las células del cúmulo circundante, facilitando la comunicación celular y ocupando hasta el 1% de la superficie total de la membrana plasmática del ovocito; el ovocito inmaduro presenta el cúmulo celular compacto e incluso dificulta la visión del propio ovocito (Leibfried & First, 1979).

- **Morfología del ovocito en maduración**

Al comienzo de la maduración del ovocito se destaca cambios nucleares y citoplasmáticos que se dan en etapas de tiempo diferentes de acuerdo a cada especie. En ovocitos bovinos, entre las 3 y 6h de iniciado la maduración, comienzan los cambios en el núcleo del ovocito que culminan con la desaparición de la membrana nuclear (GVBD); de 12 a 16h, se llega al estadio de metafase I y de las 19 a las 24h se produce la formación del primer corpúsculo polar al espacio perivitelino, llegando rápidamente al estadio de metafase II, donde se detiene nuclearmente la meiosis en espera de que ocurra la fecundación (Xu et al., 1986; Hyttel et al., 1986; Hyttel, 1988). Los cambios citoplasmáticos a lo largo de este período se resumen en una elevada actividad de síntesis proteica y una reordenación de los sistemas de microtúbulos, debido a la intensa actividad cromosómica (Hyttel et al., 1986).

Además, también existe un agrupamiento de las mitocondrias y los gránulos corticales que comienzan a situarse periféricamente (Ducibella et al., 1988). En cuanto respecta a las uniones intercelulares, comienzan a retraerse a las 3 h de iniciada la maduración y a las 18 h sólo quedan restos de las mismas en el espacio perivitelino, que a la vez que progresa la maduración, se hace cada vez mayor (Hyttel, 1988; Xu et al., 1986).

Desde las 10 hasta las 12 horas desde el inicio del proceso de maduración, el cúmulo que envuelve al ovocito comienza a expandirse, alcanzando su máxima expansión a las 18 horas desde el inicio del cultivo. La expansión se debe a la mucificación entre las células, por la presencia de ácido hialurónico en la matriz intercelular y, también, a la posible presencia de un factor desconocido que favorece la expansión y que se transfiere desde el mismo ovocito hasta el cúmulo (Hyttel et al., 1986).

- **Morfología del ovocito maduro**

Caracterizado por la completa expansión del conjunto de células y la aparición del primer cuerpo polar en la región perivitelina. A nivel nuclear, los cromosomas presentan la configuración de metafase II (Leibfried & First, 1979; Xu et al., 1986).

Los cambios citoplasmáticos no se completan hasta las 30h de haber comenzado la maduración, aunque nuclearmente la maduración finaliza a las 24 h (Hyttel, 1988). Estos cambios citoplasmáticos incluyen, sobre todo, dos procesos: la colocación de los gránulos corticales a la periferia, situándose bajo la membrana plasmática (Ducibella et al., 1988), y el agrupamiento de mitocondrias y RER en cisternas de gran tamaño (De Loos et al., 1992). En esta fase final de la maduración, sigue existiendo una alta

actividad de síntesis proteica con el fin de preparar al ovocito, nuclear y citoplasmáticamente, para la fecundación (De Loos et al., 1992).

Estos fenómenos cronológicos, descritos en la maduración corresponden tanto a los ovocitos madurados in vivo como in vitro (Hyttel, 1988). Las diferencias más notables entre ambos tipos de maduración, estriban fundamentalmente en que los ovocitos madurados in vitro sufren, por un lado, un retraso en la migración de los gránulos corticales a la periferia del ovocito y por otro, presentan un mayor número de prolongaciones celulares, provenientes de las células de la corona radiada, en el espacio perivitelino (De Loos et al., 1992).

Por consiguiente, los signos que indican la maduración in vitro son: formación del primer corpúsculo polar y llegada al estadio de metafase II, expansión y mucificación del cúmulo celular, traslado de los gránulos corticales a la periferia del ovocito y desaparición de las uniones intercelulares (De Loos et al., 1992).

2.3 Marco conceptual

- **Maduración in vitro:** La maduración del ovocito hace referencia a todos los cambios nucleares, citoplasmáticos y de membrana que sufre

el ovocito, con el fin de prepararse para ser fecundado con éxito y desarrollarse posteriormente (Picton et al., 2008).

- **Factores de crecimiento:** Los factores de crecimiento como tal son proteínas con un peso molecular inferior a los 30.000 daltons, que al contrario que las hormonas reproductivas conocidas, son sintetizados por varios órganos y tejidos, particularmente cumplen funciones endocrinas y autocrinas, y se liberan inmediatamente después de su síntesis, tienen una función mitogénica y estimuladora del desarrollo, del crecimiento celular y de tejidos (Block et al., 2007).
- **Suero:** El suero es el líquido sanguíneo que queda después de eliminar los elementos formes y fibrinógeno de la sangre. Afectan al pH del medio y actúan como quelantes de iones metálicos, contienen factores de crecimiento y ciertas cantidades variables de hormonas que inciden en la proliferación y diferenciación celular, además sirven como agentes activos de superficie (Palasz et al., 1995).
- **Superovulación:** Las primeras descripciones de superovulación fueron registradas por Smith y Engle en 1927, quienes utilizaron preparados crudos de pituitaria para inducir un incremento en la tasa de ovulación de ratones y ratas (Gordon, 1996).

- **Metafase:** La metafase es la segunda fase de la mitosis y de la meiosis que sucede después de la profase en donde esta pierde la envoltura y aparecen los microtúbulos del huso acromático (Picton et al., 2008).
- **Protocolo:** Serie de procedimientos establecidos y seguidos para realizar una investigación (Santayana et al., 2012).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Ubicación Geográfica y Temporal

El trabajo se desarrolló en el laboratorio de biotecnologías reproductivas del proyecto “Uso de biotecnología para el mejoramiento genético y desarrollo de capacidades en el manejo de alpacas en la zona alto andina de Tacna”, Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann ubicado en la ciudad de Tacna a una coordenada UTM 366907 8006025 y a una altitud promedio de 599msnm; con temperatura que fluctúa entre 22 a 30°C en época de verano y 10 a 24°C de temperatura en época de invierno.

3.1.2 Población y Muestra

Se trabajó con una muestra de 490 ovarios, aspirándose un total de 1 456 ovocitos de los cuales fueron seleccionados 1 036 ovocitos de calidad I y II siendo distribuidos para los 3 tratamientos de maduración, lecturándose como mínimo 100 ovocitos por grupo al término del proceso de maduración.

Tabla 1.

Número de ovocitos madurados y lecturados según tratamiento

	Tratamiento: Tipo de suplemento		
	SFB	IGF-I	SAS
Número de ovocitos madurados	399	297	340
Número de ovocitos lecturados	109	108	101

3.1.3 Materiales

Equipo de laboratorio.

- Incubadora de CO₂.
- Estereoscopio.
- Microscopio óptico.
- Estufa.
- Balanza analítica.

Material de laboratorio

- Micropipetas
- Puntillas para micropipeta de 0,5 - 10ul
- Puntillas para micropipeta de 20 – 100ul
- Puntillas para micropipeta de 100 - 1000ul
- Placa petri 35 x 10mm
- Placa petri 90 x 15mm

- Tubo Falcon graduado de 15ml
- Tubo Falcon graduado de 50ml
- Vasos precipitados de 50ml
- Láminas portaobjetos y cubreobjetos
- Pissetas de 500ml
- Rollos de papel toalla
- Pliegues de filtro de 25mm p/jeringa 0.2um.
- Guantes quirúrgicos
- Jeringas descartables de 3ml.
- Aguja hipodérmica n° 21.

Reactivos

- Medio de cultivo de tejido TCM-199 polvo (M 5017)
- Bicarbonato de sodio (NaHCO₃)
- HEPES
- Agua químicamente pura (Agua mili Q)
- Suero bovino fetal (SFB)
- Hormona folículo estimulante (FSH)
- Piruvato de sodio (Py)
- Gentamicina stock

- Estradiol17- β
- Suero de alpaca superovulada
- Factor de crecimiento insulínico tipo I
- Fijador carnoy
- Orceína acética 1%

3.2 Método

3.2.1 Tipo y Diseño de Investigación

El presente trabajo de investigación es de tipo experimental, el diseño aplicado es completamente aleatorio (DCA), siendo 2 tratamientos y 1 grupo control.

3.2.2 Diseño Procedimental

Obtención de los ovarios

Los ovarios fueron obtenidos de alpacas sacrificadas en el Camal Municipal de Santa Rosa de la localidad de Mazocruz. Una vez recolectados se sumergieron en una solución de transporte compuesta por Solución Fisiológica con antibiótico (100UI de Penicilina y 1mg Estreptomicina / ml), utilizando tubos falcon de 50ml que se colocaron en baño maría (termo de 2L) a una temperatura de 35 – 37°C.

Obtención y selección de ovocitos

Los Complejos Ovocito-Cúmulo (COCs) se recolectaron y seleccionaron utilizando el protocolo descrito por Ratto et al. (2005).

Se seleccionaron folículos de 2 a 6mm para ser aspirados utilizando agujas n° 21G y jeringas de 5 ml recargadas de medio de maduración, realizando este trabajo sobre una platina térmica atemperada a 37°C, el líquido folicular obtenido fue vaciado en placas Petri atemperadas para iniciar la búsqueda y selección de ovocitos.

Se evaluó los COCs clasificándolos del I al IV de acuerdo a la compactación del cúmulo y el aspecto citoplasmático, utilizando un estereomicroscopio con un aumento de 20X. Finalmente se seleccionaron sólo los ovocitos de categoría I y II para el experimento.

Obtención de suero de alpaca superovulada

Se trabajó con 8 alpacas hembras a las cuales se sometió a un tratamiento de superovulación con FSH a dosis de 200mg por animal repartidos en 3 días cada 12 horas (50mg, 30mg y 10mg). Al cuarto día del tratamiento se colectó sangre de la vena yugular de las hembras que respondieron al

estímulo, se utilizaron agujas hipodérmicas n° 21 y tubos Falcon estériles de 15ml los cuales fueron llenados al tope por cada animal.

El total de sangre colectada se dejó reposando durante 24 horas en un recipiente estéril de mayor volumen, pasado ese tiempo se procedió a centrifugar a 4 500rpm por 10 minutos y el sobrenadante obtenido fue sometido a baño María a 56°C por 30 minutos para la inactivación del complemento. El suero obtenido fue repartido en alícuotas de 2ml para ser congelados a -20°C hasta su posterior uso.

Se hizo el análisis sobre la presencia y cantidades de determinados componentes en el suero de alpaca superovulada obteniéndose como resultado: 66,07pg/ml de estradiol, 12,8mIU/ ml de FSH, 53,2g/L de proteínas totales, 34g/L de albumina, 19,2 g/L de globulina y 99,6ng/ml de Somatomedina C (IGF-I). Para ello se utilizó una fracción del suero total obtenido y se procesó dicha muestra en el laboratorio clínico -Tacna.

Maduración de los ovocitos

Se realizaron 3 tratamientos, en donde se tomó como base el protocolo de Santayana et al. (2012) con modificaciones para factores de crecimiento (Sansinema et al. 2007).

Tabla 2.*Medio TCM-199 Stock según cantidad*

COMPONENTES	CANTIDAD	
	50ml	25ml
TCM - 199 polvo (M 5017)	0,75g	0,375g
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	0,11g	0,055g
Agua para cultivo (W3500)	completar hasta 50ml	completar hasta 25ml

Fuente: Santayana et al., 2012.

Tabla 3.*Medio IVM por concentración y volumen*

Componentes del medio	Concentración	Volumen/10ml
TCM-199 stock	90%	90ml
SFB/IGF-I/SAS	10%	10ml
FSH	0,02UI/ml	10 μ l
Piruvato de sodio	0,2mM	20 μ l
Sulfato de gentamicina	50 μ g/ml	25 μ l
Estradiol 17- β	1 μ g/ml	10 μ l

SFB: suero fetal bovino, IGF-I: factor de crecimiento insulínico tipo I, SAS: suero de alpaca superovulada, FSH: hormona folículo estimulante

Fuente: Santayana et al., 2012 con modificaciones.

- Grupo control o tratamiento 1 se suplementó 10% de suero fetal bovino al medio de maduración.
- Para el tratamiento 2 se suplementó 10ng/ml de IGF tipo I al medio de maduración.
- Para el tratamiento 3 se suplementó 10% de suero de alpaca superovulada al medio de maduración.

Se preparó medio IVM en placas de cultivo estériles desechables de 35x10mm. Seguidamente, las placas se colocaron en una cámara de cultivo a 38,5°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad, durante 2h (tiempo de equilibrio) antes de colocar los ovocitos seleccionados.

Posteriormente, se colocaron entre 10 a 15 ovocitos por cada microgota. La maduración de los ovocitos se realizó en cámara de cultivo a 38,5°C, 5% CO₂ y 90% de humedad, durante 26h.

Evaluación del estadio nuclear de los ovocitos

Para visualizar las estructuras cromosómicas se utilizó una metodología de fijación y tinción basada en la técnica descrita por Chang (1951), con algunas modificaciones realizadas por Santayana et al. (2012).

Después de 26 horas de maduración, se seleccionaron al azar del medio de cultivo los ovocitos para ser fijados y teñidos, pero antes se colocaron en una solución de hialuronidasa 1 mg/ml por 1 minuto, para luego ser extraídos mediante una micropipeta de 20 µl para separar las células del cúmulo adheridas a la zona pelúcida, seguido de un lavado con PBS al 1%.

Se colocó una pequeña gota de PBS en un portaobjetos, donde se dispusieron 5 ovocitos y se cubrieron con un cubreobjetos, ejerciendo una

leve presión para evitar dañar los ovocitos. Posteriormente, el portaobjetos se sumergió en una cubeta plástica con Carnoy, un fijador a 4°C (metanol absoluto:ácido acético glacial, 3:1), durante 24 horas. Después de la fijación, los portaobjetos se retiraron, se secaron con papel absorbente y se aplicó una gota de colorante (orceína acética al 1%) en un extremo del portaobjetos. El colorante se movió por capilaridad entre portaobjetos y cubreobjetos hasta el extremo opuesto, se eliminó el exceso y se dejó reposar durante 8 minutos. Luego, se decoloraron las muestras con una solución de glicerol : ácido acético : agua destilada (1:1:3).

La morfología nuclear de los ovocitos teñidos se examinó con un microscopio óptico (objetivo de 40X) y se clasificaron en seis categorías según su estadio nuclear: Vesícula Germinal (VG), Vesícula Germinal Rota (GVBD), Metafase I (M-I), Anafase I (A-I), Telofase I (T-I) y Metafase II (MII).

Análisis de Datos

Para el análisis de datos se empleó el modelo estadístico Diseño Completamente Aleatorio (DCA). Los datos obtenidos fueron analizados a través de un análisis de varianza (ANVA) de un solo factor y las comparaciones múltiples entre los tratamientos fueron examinadas con la prueba de Duncan a un nivel de significancia de 0,05. Los datos fueron

analizados utilizando el software estadístico InfoStat (versión estudiantil).

El modelo estadístico que se utilizó:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Los componentes del modelo son:

- Y_{ij} = observaciones (% DEG., VG, GVR, MI, AI, TI y MII)
- μ = media general
- T_i = efecto de los tratamientos (Control, IGF-I y SAS)
- e_{ij} = error asociado a cada observación.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Comparar el uso de Factor de Crecimiento Insulínico tipo I y Suero de Alpaca Superovulada en los medios de maduración in vitro sobre las tasas de maduración nuclear de ovocitos de alpacas (*Vicugna pacos*).

Tabla 4.

Tasa de maduración nuclear de ovocitos de alpaca sometidos a diferentes suplementos (Suero Fetal Bovino, Factor de Crecimiento Insulínico Tipo I y Suero de Alpaca Superovulada)

Fase de maduración nuclear	Suplemento			P-valor
	Suero Fetal Bovino (%)	Suero de Alpaca Superovulada (%)	Factor de Crecimiento Insulínico tipo I (%)	
Degenerados	12,84	1,98	1,85	0,0003
Vesícula Germinal	7,34	6,93	11,11	0,4827
Vesícula Germinal Rota	2,75	4,95	9,26	0,1086
Metafase I	28,44	37,62	36,11	0,3154
Anafase I	2,75	0,99	0,93	0,4739
Telofase I	10,09	21,78	4,63	0,0005
Metafase II	35,78	25,74	36,11	0,1957
N	109	101	108	

En la tabla 4, se muestra los resultados de los dos tratamientos (suero de alpaca superovulada y IGF - I) y el grupo control (suero fetal bovino), donde se muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a la tasa de ovocitos degenerados y ovocitos en telofase I, siendo los resultados del tratamiento con suero de alpaca superovulada para telofase I superior al tratamiento con IGF-I y grupo control. Con respecto a la tasa de ovocitos maduros (metafase II), no se muestra diferencias significativas ($p > 0,05$) entre dichos tratamientos y el grupo control.

4.2 Evaluar la suplementación con Factor de Crecimiento Insulínico tipo I en los medios de maduración in vitro en reemplazo del Suero Fetal Bovino, sobre las tasas de maduración nuclear de ovocitos de alpacas (*Vicugna pacos*).

Tabla 5.

Fase de maduración nuclear de ovocitos de alpaca sometido a Factor de Crecimiento Insulínico tipo I (IGF-I)

Fase de maduración	N° de ovocitos	%
Degenerados	2	1,85
Vesícula Germinal	12	11,11
Vesícula Germinal Rota	10	9,26
Metafase I	39	36,11
Anafase I	1	0,93
Telofase I	5	4,63
Metafase II	39	36,11
Total	108	100

En la tabla 5, se observa los resultados de la tasa de maduración nuclear de ovocitos de alpaca utilizando como suplemento en el medio de maduración in vitro el factor de crecimiento insulínico tipo I incubados en un tiempo de 26 horas, lecturándose un total de 108 ovocitos, de los cuales, se observó una tasa de maduración (metafase II) de 36,11%, clasificándose al resto como no maduros, siendo un 1,85 % que se degeneró, 11,11% que no inició el proceso de maduración quedándose en vesícula germinal, un 9,26% que inició el proceso tardíamente rompiendo la vesícula germinal, y un 41,67% que se quedó en las diferentes fases de la meiosis I, indicando que estaban en proceso de maduración.

4.3 Evaluar la suplementación con Suero de Alpaca Superovulada en los medios de maduración in vitro en reemplazo del Suero Fetal Bovino sobre las tasas de maduración nuclear de ovocitos de alpacas (*Vicugna pacos*).

Tabla 6.

Fase de maduración nuclear de ovocitos de alpaca sometido a Suero de Alpaca Superovulada (SAS)

Fase de maduración	N° de ovocitos	%
Degenerados	2	1,98
Vesícula Germinal	7	6,93
Vesícula Germinal Rota	5	4,95
Metafase I	38	37,62
Anafase I	1	0,99
Telofase I	22	21,78
Metafase II	26	25,74
Total	101	100

En la tabla 6, se observa la tasa de maduración para el tratamiento con suero de alpaca superovulada, de un total de 101 ovocitos incubados a un tiempo de 26 horas, el 25,74% lograron llegar a metafase II, clasificándose al resto como no maduros, siendo un 1,98% que se degeneró, 6,93% que no inició el proceso de maduración quedándose en vesícula germinal, un 4,95% que inició el proceso tardíamente rompiendo la vesícula germinal, y un 60,39%

que se quedó en las diferentes fases de la meiosis I, indicando que estaban en proceso de maduración.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

5.1 Maduración con suero fetal bovino

En este estudio la tasa de maduración de ovocitos de alpaca con suero fetal bovino llegó a 35,78%, siendo estos resultados inferiores a los reportados por Ruiz & Correa (2007), obteniendo una tasa de 75% de ovocitos maduros en alpacas y 100% en llamas, utilizando tiempos de maduración de 27 y 30 horas respectivamente, no habiendo diferencias en el uso de suplementos para el medio de maduración en comparación al presente trabajo. Esta diferencia puede explicarse por el tiempo de maduración empleado en este estudio que fue de 26 horas, además de que la técnica utilizada para desnudar los ovocitos no fue la óptima ya que la mayoría de ovocitos teñidos no se pudieron lecturar porque aún poseían restos de células del cúmulo que cubrían casi en su totalidad el citoplasma no permitiendo visualizar el estadio nuclear en el que se encontraban.

De igual manera, estos resultados son inferiores en comparación a los reportados por Del Campo et al. (1992) que obtuvieron una tasa de 62% de ovocitos maduros en llamas utilizando la técnica de aspiración para la colecta de ovocitos y con un tiempo de maduración de 36 horas, siendo el

factor principal el tiempo de maduración que podría explicar dicha diferencia con respecto al presente trabajo.

Sin embargo, estos resultados son similares en un trabajo reportados por Del Campo et al. (1994) que obtuvieron 30% de ovocitos en metafase II reduciendo el tiempo de maduración a 30 horas, pero, además, utilizaron la técnica de corte para la obtención de ovocitos, demostrando que el tiempo y la técnica de obtención son factores fundamentales en los resultados de las tasas de maduración.

Tasas más altas obtuvieron Ratto et al. (2005) comparando los tiempos de maduración utilizando como fuente principal de proteína el suero fetal bovino, encontrando 77,7% de ovocitos en metafase II para 28 horas, 80,6% para 30 horas y 80,4% para 36 horas, no habiendo diferencias estadísticas en sus resultados, demostrando que pueden ser utilizados tiempos entre 28 y 36 horas, siendo conveniente usar menos tiempo para la maduración para lograr la menor cantidad de ovocitos maduros envejecidos y que éstos no afecten la producción de embriones, tal como lo demuestran Landeo et al., (2016).

5.2 Maduración con factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I)

Resultados diferentes en llamas reportan Sansinema et al. (2007) quienes obtuvieron una tasa de 74% de ovocitos en metafase II frente al 36,11% logrado en el presente trabajo en alpacas, esta diferencia puede atribuirse a que Sansinema et al. utiliza, además de IGF-I, factor de crecimiento epidermal (EGF), hormona luteinizante (LH) y suero fetal bovino, aunque Lorenzo et al. (1994), demostraron en ovocitos bovinos que el uso de factores de crecimientos en conjunto o separados y en ausencia de suero fetal bovino y gonadotropinas mejoran la maduración de ovocitos, logrando un 61,4% de ovocitos maduros para EGF + IGF-I, 52,1% para EGF y 49,5% para IGF-I, pudiendo utilizar sólo un factor de crecimiento.

Por otro lado, Sansinema et al. (2007) utilizaron un tiempo de 30 horas de maduración frente a las 26 horas que se utilizó en la presente investigación, dándoles más tiempo para que más ovocitos que están en anafase I y telofase I lleguen a metafase II con la desventaja de que los primeros ovocitos en llegar a metafase II puedan envejecer más rápido y a su vez disminuya las posibilidades de una exitosa fertilización in vitro como lo demuestran Landeo et al. (2016) en sus resultados al comparar las tasas de blastocistos obtenidos de ovocitos maduros a 26, 30, 34, 38 y 42 horas,

obteniendo una mayor tasa de blastocistos a las 26 horas y una menor tasa a la 42 horas.

5.3 Maduración con suero de alpaca superovulada (SAS)

Resultados en ovinos usando suero de ovino superovulado reportó Chávez (2017), obteniendo una tasa de maduración de 94,34%, utilizando además LH en el medio. No se han reportado trabajos similares en alpacas, siendo este el primer reporte con respecto al uso de suero de alpaca superovulada en medios de maduración in vitro, obteniendo una tasa de 25,74%, siendo resultados totalmente diferentes en comparación al trabajo en ovinos. Sin embargo, se observó que este grupo obtuvo una mayor tasa de ovocitos en telofase I logrando un 21,78% frente a los grupos con IGF-I y con suero fetal bovino, que obtuvieron un 4,63% y 10,09% respectivamente, siendo que si se otorgaba más horas de maduración probablemente alcanzaría un mayor porcentaje de ovocitos maduros, aun así, no dejan de ser resultados alentadores en cuanto al uso de otros sueros diferentes al suero fetal bovino, siendo de fácil obtención.

5.4 Contrastación de hipótesis

- Ho: La tasa maduración nuclear de ovocitos es similar con factor de crecimiento insulínico tipo I y suero de alpaca superovulada en

comparación con suero fetal bovino en medios de maduración in vitro.

- Ha: La tasa maduración nuclear de ovocitos es mejor con factor de crecimiento insulínico tipo I y suero de alpaca superovulada en comparación con suero fetal bovino en medios de maduración in vitro.
- Nivel de significancia: $\alpha = 0,05$
- Prueba estadística: Duncan
- Valor crítico:

Si $P < 0,05$ = se rechaza la H_0 , se acepta la H_a

Si $P > 0,05$ = se acepta la H_0 , se rechaza la H_a

- Toma de decisión:

En la estadística no hay diferencias significativas entre las tasas de los dos tratamientos y el grupo control en donde p valor es $> 0,05$. Por ende, se rechaza la H_a y se acepta la H_0 .

- Conclusión:

Ambos tratamientos se comportan de manera similar sobre las tasas de maduración con respecto al grupo control, es decir que se observaran las mismas tasas de ovocitos en metafase II al comparar los dos tipos de suplementos.

CONCLUSIONES

- El suero de alpaca superovulada muestra mejores resultados con respecto a ovocitos en telofase I frente al uso de IGF-I y suero fetal bovino, siendo los más próximos a llegar a metafase II.
- El factor de crecimiento insulínico tipo I permite el proceso de la maduración in vitro en la misma medida que un medio con suero fetal bovino.
- El suero de alpaca superovulada permite el proceso de la maduración in vitro igual que un medio con suero fetal bovino.

RECOMENDACIONES

- Realizar trabajos con respecto al uso de suero de alpaca superovulada y factor de crecimiento insulínico tipo I comparando tiempos de maduración.
- Comparar tasas de embriones obtenidos de ovocitos madurados con suero de alpaca superovulada frente a otros suplementos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeydeera, L. R. (2002). In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology*; 57, 257-273.
- Aller, J. (2015). Reproducción en Camélidos Sudamericanos; Argentina; Inta-Balcarce, 215-245.
- Andersen, C. (1993). Characteristics Of Human Follicular Fluid Associated With Successful Conception After In Vitro Fertilization. *J Clin Endocry Metab*, 77, 1227 – 1234.
- Apaza, N., Sapaná, R., Huanca, T. & Huanca, W. (2001). Inseminación Artificial en alpacas con semen fresco en comunidades campesinas. *Rev. Invest. Vet. Perú, Suppl. 1*, 435 - 438.
- Block, J., Fischer-Brown, A., Rodina, T., Ealy, A. & Hansen P. (2007). The effect of in vitro treatment of bovine embryos with IGF-I on subsequent development in utero to day 14 of gestation. *Theriogenology* 68, 153-161.
- Chang, M. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168, 697.

- Chavez, J. (2017). Efecto del suero de oveja súper ovulada sobre la maduración y fertilización in vitro de ovocitos de ovino. Tesis de pregrado. Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú.
- De Loos, F., van Maurik, P., van Beneden, T. & Kruij, T. (1992). Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro. *Mol. Reprod. Dev*, 31, 208-214.
- Del Campo, M., Del Campo, C., Donosos, M., Berland, M. & Mapletoft, R. (1994). In vitro fertilization and development of Lama glama oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology*, 41, 1219-1229.
- Del Campo, M., Donosos, M. & Del Campo, C. H. (1992). In vitro maturation of Llama (*Lama glama*) oocytes. *Proc 12th Int Cong Anim Reprod*, 1, 324.
- Donadeu, F. & Ginther, O. (2002). Changes in Concentrations of Follicular Fluid Factors During Follicle Selection In Mares. *Biol Reprod*, 66, 1111 – 1118.
- Ducibella, T., Anderson, E., Albertini, D., Aalbero, J. & Rangarajan, S. (1988). Quantitative studies of changes in cortical granule number and

distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Devl. Biol.* 130, 184 - 197.

Filipiak, Y. & Larocca, C. (2010). Fertilización in vitro en bovinos. Manual teórico-práctico. Área de biotecnología de la reproducción Animal. Facultad de Medicina veterinaria. Universidad de la República Montevideo, República Oriental del Uruguay.

Freyre, G. 2006. Experiencias de Transformación y Comercialización de la fibra de alpacas. Conferencia Internacional de Camélidos Sudamericanos. 30-31 de marzo, Arequipa – Perú.

Gigli, I., Russo, A. & Agüero, A. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *InVet* 8: 183 – 204.

Glied, D. W., Rosenkrans, C.F., Rorie, R.W. & Rakes, J.M. (1996). Effects of oocyte maturation length, sperm capacitation time, and heparin on bovine embryo developmen. *Journal of Dairy Science*, 79(4).

Gordon, I. (1996). Reproducción Controlada del Ganado Vacuno y Búfalo. Editorial acribia. S.A. Zaragoza, España.

Gougeon, A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev*, 17, 121 - 155.

Hamano, S. & Kuwayama, M. (1993). In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*, 39, 703-712.

Harper, K. & Brackett, B. (1992 a). Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol. Repr.*, 46, 256 - 260.

Harper, K. & Brackett, B. (1992 b). Enhanced bovine oocyte quality after in vitro maturation (IVM) with insulin-like growth factor-I (IGF-I) and gonadotropins. *Biol. Reprod.*, 46, 67.

Huanca, W., Condori, R., Cainzos, J., Chileno, M., Quintela, L., Becerra, J. & Herradon, P. (2009). In Vitro Maturation and In Vitro Fertilization of Alpaca (*Vicugna Pacos*) Oocytes: Effect of time of incubation on nuclear maturation and cleavage. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(1), 327-327.

Huanca, W., Condori, R., Chileno, M., García, P., Cainzo, J. & Becerra, J.

- (2014). Evaluación de cuatro tiempos de cultivo sobre la tasa de maduración y división post fecundación in viro de ovocitos de alpaca. *Rev Inv Vet Perú*, 25(4), 468 – 476.
- Hyttel, P., Xu, K., Smith, S. & Greve, T. (1986). Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in cattle. *J. Reprod. Fert.*, 78, 615-625.
- Hyttel, P. (1988). Oocyte maturation and fertilization in cattie. Ultrastructural aspects. (Tesis doctoral). The Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen.
- Kalinowski, R., Berlot, C., Jones, T., Ross, L. & Mehlmann, L. (2004). Maintenance of meiotic prophase arrest in vertebrate oocytes by a Gs protein-mediated pathway. *Dev Biol.*, 267, 1 - 13.
- Landeo, L., Manrique, L., Ramos, Y., Contreras, J., Artica, M. & Ruiz, J. (2016) Evaluación del tiempo de maduración de ovocitos de alpaca (vicugna pacos) en la producción de embriones por fecundación in vitro. XXXIX Reunión Científica de la Asociación Peruana de Producción Animal. Lambayeque – Perú.
- Lee, E. S., Fujii, Y. & Fukui, Y. (1996). A comparative study on developmental capacity to blastocysts derived from 1- and 2(3)-cell

bovine embryos after in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology*, 45(6), 1151-1162.

Leibfried, M. & First, N. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Anim. Sci.* 48, 76 - 86.

Lonergan, P., Vergos, E., Kinis, A., Sharif, H. & Gordon, I. (1994). The effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for IVM. *Theriogenology*, 35, 231.

Lorenzo, P. L., Illera, M. J., Illera, J. C. & Illera, M. (1994). Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101, 697-701.

Mehlmann, L. (2005). Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, 130, 791 - 799.

Mehlmann, L.; Jones, T. & Jaffe, L. (2002). Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science*, 297, 1343-1345.

- Novoa, C., Franco, E., García, W. & Pezo, D. (1999). Dosis de Gonadotropinas (eCG y hCG), superovulación y obtención de embriones en alpacas. RIVEP. Perú 10 (1), pp.48-53.
- Palasz, A., Tornesi, M. B., Archer, J. & Mapletoft, R. J. (1995). Media alternatives for the collection, culture and freezing of mouse and cattle embryos. *Theriogenology* 44, 705-714.
- Picton, M., Harris, S., Muruvi, W. & Chambers, E. (2008). The in vitro growth and maturation of follicle. *Reproduction*, 136, 703-715.
- Ratto, M., Berland, M., Huanca, W., Singh, J. an& Adams, G. (2005). In vitro and in vivo maturation of llama oocytes. *Theriogenology*, 63, 2445-2457.
- Ratto, M., Silva, M., Huanca, T., Cordero, A. & Huanca, W. (2015). Inducción de superovulación en camélidos. *Spermova*, 5(2), 253-257.
- Ruiz, J. A. & Correa, J. E. (2007). Maduración in vitro de ovocitos de alpaca y llama aspirados vía laparoscópica. I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú.

- Ruiz, J. (2015). Estado de la producción de embriones in vitro en Camélidos Sudamericanos. *Spermova*, 5(2), 264-269.
- Santayana, P., Mendoza, J., Landeo, L., Mujica, F. & Ruiz J. (2012). Tiempo de maduración de ovocitos de alpaca en el desarrollo embrionario por fecundación in vitro. VI Congreso Mundial de Camélidos. Arica. Chile.
- Sansinema, M., Taylor, S., Taylor, P., Schmidt, E., Denniston, R. & Godke, R. (2007). In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Animal Reproduction Science*. 99, 342-353.
- Seneda, M. M., Esper, C. R., Garcia, J. M., Olivera, J. A. & Vantini, R. (2001). Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal recovery. *Anim Reprod Sci*. 67, 37-43.
- Van de Wiel, D., Bar-Ami, S., Tsafiriri, A. & De Jong, F. (1983). Oocyte maturation inhibitor, inhibin and steroid concentrations in porcine follicular fluid at various stages of the oestrous cycle. *JReprod Fertil*. 68, 247 -252.
- Xu, P., Oreve, T., Smith, S. & Hyttel, P. (1986). Chronological changes of

bovine follicular oocyte maturation in vitro. *Acta Vet. Scand.* 27, 505-519.

ANEXOS

Anexo 1. Número de ovocitos en fases de maduración nuclear por tratamiento

Tratamiento	N° de ovocitos	DEG	VG	VGR	M - I	A - I	T - I	M - II
Control	109	14/109	8/109	3/109	31/109	3/109	11/109	39/109
tratamiento 1: IGF-I	108	2/108	12/108	10/108	39/108	1/108	5/108	39/108
Tratamiento 2: SAS	101	2/101	7/101	5/101	38/101	1/101	22/101	26/101

IGF-I: factor de crecimiento insulínico tipo I, SAS: suero de alpaca superovulada, DEG: degenerados, VG: vesícula germinal, VGR: vesícula germinal rota, M-I: metafase I, A-I: anafase I, T-I: telofase I y M-II: metafase II.

Anexo 2. Registro de muestras

Día	N° de ovarios	Calidad COC'S recolectados				N° COC'S en maduración				Hora de maduración	N° COC'S leídos
		I	II	III	IV	Total	SFB	SAS	IGF		
1	26	53	14	67	45	-	-	45	2:45 p.m.	No se leió, error de tinción	
2	16	36	16	52	34	-	-	34	3:38 p.m.	No se leió, error de tinción	
3	16	46	15	61	24	12	10	46	3:50 p.m.	9	
4	30	26	10	36	26	-	-	26	4:14 p.m.	5	
5	23	40	13	53	20	10	10	40	2:00 p.m.	23	
6	16	60	20	80	20	20	20	60	2:40 p. m.	22	
7	36	89	87	176	30	29	30	89	3:30 p.m.	53	
8	9	30	10	40	10	10	10	30	3:38 p.m.	1	
9	8	17	9	26	10	-	7	17	2:25 p.m.	7	
10	14	56	5	31	-	-	56	56	2:52 p.m.	44	
11	34	71	33	104	40	31	-	71	1:59 p.m.	29	
12	56	111	51	162	38	19	54	111	2:36 p.m.	Corte de luz, no se leió	
13	19	19	NC	19	19	-	-	19	2:10 p.m.	Corte de luz, no se leió	
14	10	30	3	33	-	30	-	30	2:30 p.m.	5	
15	29	70	17	87	30	40	-	70	1:40 p.m.	27	
16	78	100	100	200	-	-	100	100	3:50 p.m.	29	
17	53	106	NC	106	53	53	-	106	5:16 p.m.	12	
18	17	86	NC	86	-	86	-	86	3:26 p.m.	52	
Total	490	1036	420	1456	399	340	297	1036		318	

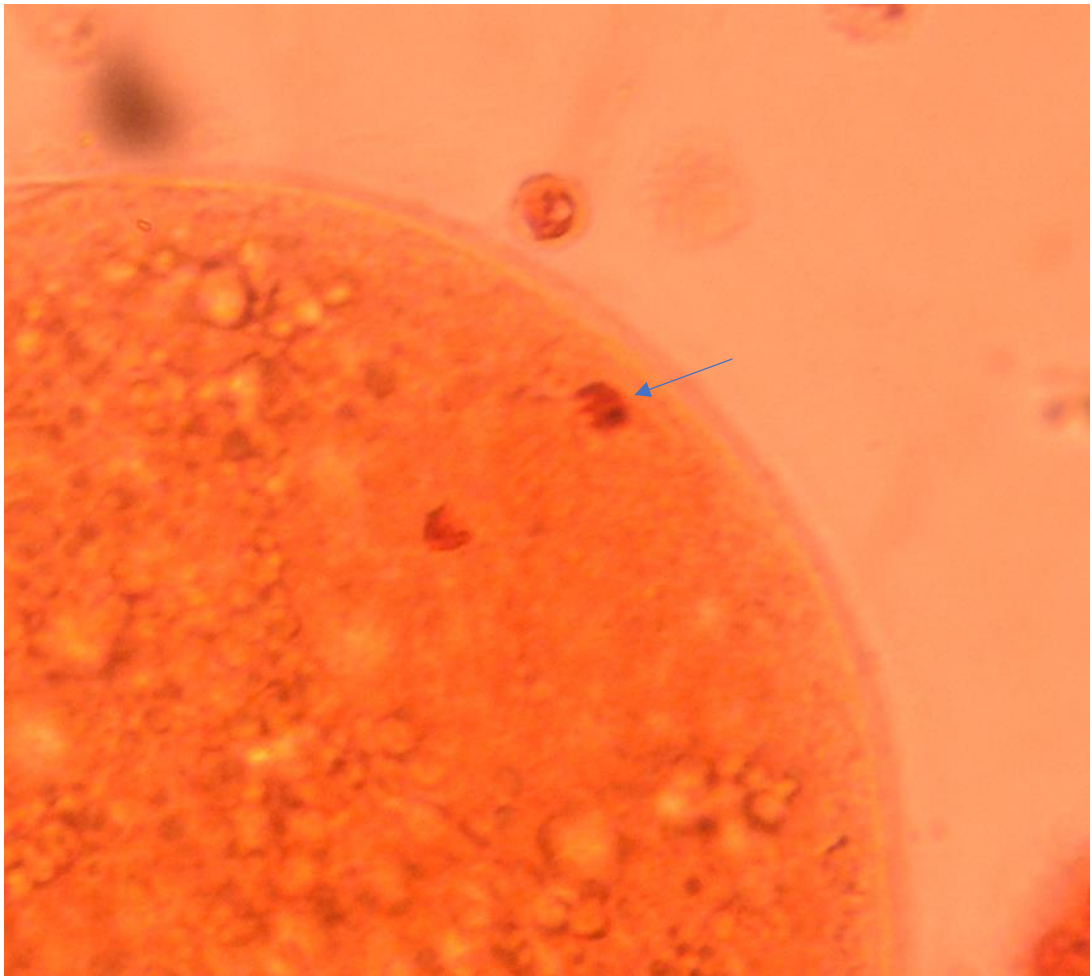
SFB: suero fetal bovino, IGF-I: factor de crecimiento insulínico tipo I, SAS: suero de alpaca superovulada,

COC: complejo ovocito-cúmulo, NC: no se contó

Anexo 3. Registro de lectura de ovocitos sometidos a maduración nuclear

Día	SFB								SAS								IGF							
	MI	AI	TI	MII	VG	VGR	DEG	TOTAL	MI	AI	TI	MII	VG	VGR	DEG	TOTAL	MI	AI	TI	MII	VG	VGR	DEG	TOTAL
1	1	-	3	3	-	-	2	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	2	2	-	1	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	2	-	1	7	-	-	6	16	1	-	-	2	-	-	2	5	1	-	-	1	-	-	-	2
4	1	-	-	2	-	1	-	4	2	-	3	3	-	-	-	8	2	-	1	4	1	-	2	10
5	6	1	4	11	1	-	5	28	1	-	3	6	-	-	-	10	4	-	1	4	1	5	-	15
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	5	1	-	-	7
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	1	1	20	3	3	-	44
9	11	-	-	6	3	2	-	22	-	-	-	2	2	3	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2	1	1	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-
11	10	2	3	8	2	-	-	25	2	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	-	2	5	6	2	-	29
13	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	2	5	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	26	1	14	6	4	1	-	52	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	31	3	11	39	8	3	14	109	38	1	22	26	7	5	2	101	39	1	5	39	12	10	2	108
	35,78								25,74								36,11							

SFB: suero fetal bovino, IGF-I: factor de crecimiento insulínico tipo I, SAS: suero de alpaca superovulada, DEG: degenerados, VG: vesícula germinal, VGR: vesícula germinal rota, M-I: metafase I, A-I: anafase I, T-I: telofase I y M-II: metafase I



Anexo 4. Ovocito de alpaca en estadio de Anafase I con los cromosomas desplazándose hacia los polos del huso acromático (flecha azul). Tinción con orceína acética al 1%. Microscopio óptico objetivo 40x.