



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



EVALUACIÓN DE LA TASA DE FECUNDACIÓN (*in vitro*) Y
POLIESPERMIA DE OVOCITOS CON SEMEN FRESCO Y
CONGELADO EN ALPACAS

TESIS

PRESENTADA POR:

PERCY HERMOGENES CHUCTAYA LUPO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2018



DEDICATORIA

A Dios, Por haberme permitido llegar hasta este punto importante y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres Estela y Luis por su incondicional apoyo en todas las etapas de mi vida, tanto en mis logros académicos y familiares, así como su paciencia y rigor en mis fracasos y tristezas.

A mi abuelo Juan Pablo (Q.E.P.D) por brindarme su cariño, alegría y sencillez en la vida, que Dios lo tenga en su gloria siempre.

Percy Hermógenes Chuctaya Lupo



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Altiplano y a los docentes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por haberme brindado todos sus conocimientos para mi formación profesional.

Mi infinita gratitud a mis padres Estela y Luis por brindarme su incondicional apoyo en todas las etapas de mi formación académica y moral a pesar de mis errores como hijo.

Dr. Julio Málaga Apaza, por el asesoramiento y la exigencia profesional durante la ejecución de la presente investigación.

Al Programa Nacional de Investigación en Camélidos del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA), por el apoyo logístico y técnico para la realización del presente proyecto.

Dr. Teodosio Huanca Mamani (Q.E.P.D), M.V.Z Rómulo Zapana Valdivia (Q.E.P.D), por su asesoría y todo el apoyo técnico brindado en vida.

Blga. Lariza Evelyn Pahuara Farfan, M.V.Z. Juan Armando Nina Zuñiga, M.V.Z Jhunion Ccopa Callata, por su gran amistad, apoyo y asesoramiento que me brindaron durante la elaboración, ejecución y culminación del presente trabajo de investigación.

Percy Hermógenes Chuctaya Lupo



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

RESUMEN 9

ABSTRACT..... 10

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. OBJETIVO GENERAL 12

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 12

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. MARCO TEÓRICO..... 13

2.1.1. Fecundación *in vitro* para realizar clivaje y tinción..... 13

2.1.2. Cultivo de embriones *in vitro* para evaluar clivaje..... 21

2.1.3. Evaluación de la poliespermia..... 22

2.2. ANTECEDENTES EN LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* DE CAMÉLIDOS

SUDAMERICANOS..... 27

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO 30

3.1.1. Población 30

3.1.2. Muestra 30

3.2. MATERIALES..... 30



3.2.1. Material experimental	30
3.2.2. Material de laboratorio.....	31
3.2.3. Equipos de laboratorio	33
3.2.4. Indumentaria de laboratorio.....	34
3.3. METODOLOGÍA.....	34
3.3.1. Fecundación <i>in vitro</i> de ovocitos de alpaca	34
3.3.2. Tinción con colorante de fluorescencia Hoechst 33342 y tasa de poliespermia.....	40
3.3.3. Cultivo <i>in vitro</i> para evaluación de clivaje	41
3.3.4. Análisis estadístico.	43
CAPÍTULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. TASA DE CIGOTOS FERTILIZADOS <i>IN VITRO</i> CON SEMEN FRESCO Y CONGELADO EN DOS TIEMPOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES ESPERMÁTICAS.	44
4.2. TASA DE POLIESPERMIA DE OVOCITOS FERTILIZADOS <i>IN VITRO</i> CON SEMEN FRESCO Y CONGELADO EN DOS TIEMPOS Y CON DIFERENTES CONCENTRACIONES.....	47
V. CONCLUSIONES.....	51
VI. RECOMENDACIONES.....	52
VII. REFERENCIAS BILIOGRÁFICAS	53
ANEXOS.....	66

Área: Reproducción en alpacas.

Tema: Tasa de fecundación con semen fresco y congelado.

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 27 de diciembre 2018



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Tratamientos para FIV según concentración, estado de semen y tiempo de FIV.....	39
Tabla 2.	Tasa de clivaje de ovocitos de alpaca fertilizados con semen fresco a diferentes tiempos y concentraciones espermáticas.....	44
Tabla 3.	Tasa de poliespermia de ovocitos fertilizados <i>in vitro</i> con semen fresco y congelado con 2 tiempos y con diferentes concentraciones	47
Tabla 4.	Medio de Lavado (D-PBS Stock), para 500 μ L.....	66
Tabla 5.	Medio de Maduración TCM-199, para 10 mL.....	66
Tabla 6.	Medio de Fecundación Fertil-TALP de trabajo para 10 mL.....	66
Tabla 7.	Medio de Capacitación Sperm-TALP de trabajo para 10 mL	67
Tabla 8.	Medio de Cultivo SOF de trabajo para 10 mL.....	67
Tabla 9.	Resultados obtenidos del clivaje de ovocitos fecundados <i>in vitro</i> con espermatozoides provenientes de semen fresco bajo 2 tiempos y 3 concentraciones espermáticas.	68
Tabla 10.	Resultados de clivaje de ovocitos fecundados <i>in vitro</i> con espermatozoides provenientes de semen congelado bajo 2 tiempos y 3 concentraciones espermáticas.....	69
Tabla 11.	Resultados de cigotos con poliespermia fecundados <i>in vitro</i> con espermatozoides provenientes de semen fresco, bajo 2 tiempos y 3 concentraciones espermáticas.	70
Tabla 12.	Resultados de cigotos con poliespermia fecundados con espermatozoides provenientes de semen congelado, bajo 2 tiempos y 3 concentraciones espermáticas.....	71



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ampliaciones sucesivas de la cámara de Neubauer. (World Health Organization, 2010).	18
Figura 2.	Ovocitos de camello fecundados <i>in vitro</i> con tinción Hoechst 33342. (Wani et al., 2008)	25
Figura 3.	Lavado de ovarios colectados de animales beneficiados en camal.	72
Figura 4.	Seccionamiento folicular mediante método de “Slicing”.....	72
Figura 5.	Clasificación de los CCOs.....	73
Figura 6.	Plaqueo y rotulado del medio de Maduración TCM-199.....	73
Figura 7.	Colocación del medio TCM-199 junto los CCOs en la incubadora.	74
Figura 8.	Evaluación de la maduración de ovocitos en medio TCM (36 horas)..	74
Figura 9.	Colecta de semen mediante Vagina Artificial colocada en maniquí.....	75
Figura 10.	Muestra de semen diluída en Steridyl® y colocada a baño maría.....	75
Figura 11.	Descongelación y dilución del semen congelado en medio Sperm-TALP.	76
Figura 12.	Tubo Falcon con la columna de Percoll y colocación en la centrífuga.	76
Figura 13.	Placa Petri con gotas de medio Fertil TALP para lavado y Paca de 6 pocillos para FIV.	76
Figura 14.	Clivaje de cigotos	77
Figura 15.	Tinción fluorescente de cigotos con Hoechst 33345.....	77



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

- °C: Grados centígrados
- AA: Aminoácidos.
- ATB: Antibiótico.
- BSA: Albúmina sérica bovina.
- CC: Capas del Cúmulo
- CCO: Complejo cúmulo ovocito.
- CIV: Cultivo *in vitro*.
- CO₂: Dióxido de carbono.
- EGF: Epidermal growth factor, Factor de crecimiento epidermal.
- FAF: Fat-acid free, Libre de ácidos grasos.
- FIV: Fecundación *in vitro*.
- FSH: Hormona folículo estimulante.
- LH: Hormona luteinizante.
- MIV: Maduración *in vitro*.
- mM: milimolar.
- mg: miligramo.
- mL: mililitro.
- nm: Nanómetro
- O₂: Oxígeno.
- PBS: Solución buffer fosfato.
- PHE: Penicilamina, Hipotaurina, Epinefrina.
- SOF: Syntetic oviductal fluid, Fluido oviductual sintético.
- TCM: Medio de cultivo tisular.
- μL: microlitro.
- μg: microgramo.
- SFB: Suero fetal bovino.



RESUMEN

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Producción de Embriones del C.I.P Quimsachata, INIA-Illpa, el objetivo fue evaluar la tasa de fecundación *in vitro* (FIV) y poliespermia de cigotos de semen fresco y congelado de alpaca, se tomaron 3117 ovocitos y se fecundaron con concentraciones espermáticas de 0.5, 1 y 1.5 x10⁶ por mL de semen fresco; 2, 4 y 6 x10⁶ por mL de semen congelado, en muestras de 20 a 25 ovocitos con tiempos de 18 y 24 horas de FIV, la evaluación del clivaje se hizo a 48 y 72 horas para ovocitos con semen fresco y congelado respectivamente y la poliespermia se evaluó mediante tinción fluorescente Hoechst después de cada FIV, se utilizó el estadístico Ji-cuadrado en busca de diferencia, resultando tasas de clivaje de 35.92% (37/103), 23.58% (25/106), 13.64% (15/110) a 18 horas; 15.25% (18/118), 13.22% (16/121), 12.40% (16/12) a 24 horas para muestras con concentraciones espermáticas de 0.5, 1 y 1.5 x10⁶/mL de semen fresco; 14,16% (16/113), 9.1% (10/111), 6.96% (8/115) a 18 horas; 10.34% (12/116), 8.62% (10/116), 7.26% (9/124) a 24 horas para muestras con concentraciones espermáticas de 2, 4 y 6 x10⁶/mL de semen congelado; mientras que tasas de poliespermia fueron de 29.41% (40/136), 43.08% (56/130), 55.46% (66/119) a 18 horas; 68.70% (79/115), 75.65% (87/115), 83.62% (97/116) a 24 horas con concentraciones espermáticas de semen fresco (0.5, 1 y 1.5 x10⁶/mL); 75.65% (87/115), 85.84% (97/113), 89.29% (100/112) a 18 horas; 85.12% (103/121), 83.47% (101/121), 90.98% (11/122) a 24 horas con concentraciones espermáticas congeladas (2, 4 y 6 x10⁶/mL), se halló diferencia ($p \leq 0.05$) en las tasas clivaje y polispermia usando distintas concentraciones de espermatozoides y tiempos de fecundación, así como una relación inversa entre concentración y tasa de fecundación y relación directa entre tasa poliespermia y concentración.

Palabras Clave: Alpaca, clivaje, fecundación, poliespermia, tinción fluorescente.



ABSTRACT

The present study was carried out in the Embryo Production Laboratory of the CIP Quimsachata, INIA-Ilpa, the objective was to evaluate the *in vitro* fertilization rate (IVF) and polyspermia of fresh and frozen alpaca semen zygotes, 3117 oocytes and they were fertilized with sperm concentrations of 0.5, 1 and 1.5 x10⁶ per mL of fresh semen; 2, 4 and 6 x10⁶ per mL of frozen semen, in samples of 20 to 25 oocytes with IVF times of 18 and 24 hours, the cleavage evaluation was made at 48 and 72 hours for oocytes with fresh and frozen semen respectively and the Polyspermia was evaluated by Hoechst fluorescent staining after each IVF, the Chi-square statistic was used in search of difference, resulting cleavage rates of 35.92% (37/103), 23.58% (25/106), 13.64% (15 / 110) at 18 hours; 15.25% (18/118), 13.22% (16/121), 12.40% (16/12) at 24 hours for samples with sperm concentrations of 0.5, 1 and 1.5 x10⁶ / mL of fresh semen; 14.16% (16/113), 9.1% (10/111), 6.96% (8/115) at 18 hours; 10.34% (12/116), 8.62% (10/116), 7.26% (9/124) at 24 hours for samples with sperm concentrations of 2, 4 and 6 x10⁶ / mL of frozen semen; while the polyspermia rates were 29.41% (40/136), 43.08% (56/130), 55.46% (66/119) at 18 hours; 68.70% (79/115), 75.65% (87/115), 83.62% (97/116) at 24 hours with fresh semen sperm concentrations (0.5, 1 and 1.5 x10⁶ / mL); 75.65% (87/115), 85.84% (97/113), 89.29% (100/112) at 18 hours; 85.12% (103/121), 83.47% (101/121), 90.98% (11/122) at 24 hours with frozen sperm concentrations (2, 4 and 6 x10⁶ / mL), a difference ($p \leq 0.05$) was found in cleavage and polyspermia rates using different sperm concentrations and fertilization times, as well as an inverse relationship between concentration and fertilization rate and a direct relationship between polyspermia rate and concentration.

Keywords: Alpaca, cleavage, fertilization, fluorescent stain, polyspermia.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La alpaca (*Vicugna pacos*) es uno de los cuatro camélidos sudamericanos que se encuentra en nuestro país y es el camélido doméstico que tiene mayor importancia productiva, dicha importancia radica principalmente en su fibra considerada la segunda más fina de los camélidos; solamente después de la vicuña; y también su carne que es reconocida por las características nutricionales particulares que posee (Wheeler, 2012) Actualmente su población ascendió a más de cuatro millones de ejemplares en el 2014 (INEI, 2016) y su crianza encierra una serie de actividades que son de vital importancia para la supervivencia de las poblaciones rurales en el Perú (Bustinza, 2001)

En las especies domésticas de interés económico, como en el bovino, se emplean biotecnologías reproductivas para contribuir a la mejora genética; sin embargo, estudios sobre biotecnología reproductiva en alpacas son bastante limitados sobre todo en producción de embriones (Miragaya *et al.*, 2002), debido a que el aspecto reproductivo de las alpacas se caracterizan por su baja tasa reproductiva, teniendo las hembras un promedio de cuatro crías durante su vida con una gestación que dura aproximadamente 341 a 345 días con una ovulación inducida, lo cual la limita a tener una cría por año en las mejores condiciones y los reproductores machos se caracterizan por tener una edad tardía para el empadre. Este aspecto es desventajoso para el aprovechamiento de hembras de buena calidad genética (García *et al.*, 2005) y a su vez limita en parte la posibilidad de desarrollar un programa de mejora genética. Ante esta situación, la implementación de técnicas de reproducción asistida pueden ser una excelente herramienta para lograr aumentar la confianza en la selección de las hembras y en consecuencia el mejoramiento genético de alpacas (Novoa *et al.*, 1999).



Una alternativa que viene dando buenos resultados para estas desventajas es la producción de embriones *in vitro* (PIV) el cual comprende etapas como maduración (MIV), fecundación (FIV) y cultivo *in vitro* (CIV) de embriones, los cuales han sido adaptados de protocolos diseñados para vacunos. (Herradón *et al*, 2007)

Dentro de la fecundación *in vitro* de alpacas existen varios estudios tanto en el ámbito nacional como internacional, pero aún no se establece un protocolo definido que pueda brindar buenos resultados (Ruiz, 2015).

1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la tasa de fecundación y poliespermia de ovocitos fecundados con espermatozoides provenientes de semen fresco y congelado en alpacas.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la tasa de fertilidad utilizando concentraciones de 0.5, 1 y 1,5 millones de espermatozoides/mL provenientes de semen fresco y 2, 4 y 6 millones de espermatozoides/mL provenientes de semen congelado en tiempos de 18 y 24 horas de FIV.

- Evaluar la tasa de poliespermia utilizando concentraciones de 0.5, 1 y 1,5 millones de espermatozoides/mL provenientes de semen fresco y 2, 4 y 6 millones de espermatozoides/mL provenientes de semen congelado en tiempos de 18 y 24 horas de FIV.



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. MARCO TEÓRICO.

2.1.1. Fecundación *in vitro* para realizar clivaje y tinción.

La fecundación *in vitro* se ha definido como la penetración de espermatozoides con capacidad de fecundar en ovocitos maduros fuera del genital femenino (Lopera, 2009).

En general, se considera fertilizado a aquel ovocito que ha emitido el segundo corpúsculo polar y se visualizan los pronúcleos masculino y femenino y la cola espermática (Del Campo, 1993). Sin embargo, no siempre es posible la visualización de todas las estructuras y se propone la formación de los primeros blastómeros como criterio (Shioya *et al.*, 1988; Fukui *et al.*, 1989).

2.1.1.1. Colección de semen.

La colección empleando vagina artificial ha presentado los mejores resultados en la colecta de semen y es la más empleada. La principal ventaja es que permite que el macho monte el maniquí y eyacule en el periodo que lo realiza naturalmente además que una adecuada manipulación y control de la temperatura evita que el semen sufra cambios dramáticos que disminuyan su viabilidad (Bustanza, 2001).

También existen otros métodos de obtención de semen como la desviación de los conductos deferentes, que consiste en seleccionar previamente al animal según buenas características reproductoras, luego realizar por medio de una intervención quirúrgica seccionar ambos conductos deferentes y redirigirlas por debajo del tejido subcutáneo hacia una nueva salida en forma de fistula en la zona inguinal de la cara interna de la pierna (Pérez *et al.*, 2014). La ventaja de este método es que la concentración de espermatozoides es mayor que en las demás técnicas y es más fácil la manipulación de



los espermatozoides ya que están libres de filancia e impurezas y es apto para utilizarlo en la fecundación *in vitro* (Pérez *et al.*, 2017; Pacompia, 2017; Arque, 2017).

2.1.1.2. Evaluación de la motilidad espermática.

Los espermatozoides de mamíferos adquieren la capacidad de movimiento durante el transporte por el epidídimo. La motilidad flagelar es estimulada tras la eyaculación y se modula durante el tránsito del espermatozoide a través del aparato reproductor de la hembra. Este tránsito implica cambios secuenciales importantes en los patrones de movimiento espermático, mostrando diferencias en cuanto a la longitud de la onda flagelar (movimiento asimétrico) o cambios en el desplazamiento lateral de la cabeza (Muiño, 2008), sugiriendo que el espermatozoide necesita primero sufrir una activación en la motilidad (hiperactivación) que le permita atravesar el tracto genital de la hembra y posteriormente, cambios estructurales en el acrosoma dándole la capacidad de fecundación (penetrar la pared del ovocito) (Turner, 2003). Por todo ello, la motilidad del espermatozoide es una característica fundamental a tener en cuenta en la evaluación de la calidad seminal.

La determinación de la motilidad normalmente se hace, de forma subjetiva, mediante el examen microscópico realizado por un técnico experimentado y bajo los siguientes parámetros (para semen fresco), 0% se considera inmóvil, 5 al 10% como mala, 30 al 40% como regular, 50 al 60% como buena y de 70 a más, como excelente (Sorensen, 1991; Illera, 1994).

Dentro de la fecundación *in vitro*, la motilidad juega un papel importante inicialmente ya que es fuente de espermatozoides con capacidad fecundante dentro del medio FIV. La fuente de los espermatozoides con el que se hicieron los primeros ensayos FIV, fueron obtenidos de epidídimos de testículos de animales beneficiados en llamas (Del campo, 1994) y alpacas (Gómez *et al.*, 2002). Actualmente epidídimos de alpacas



beneficiadas en camal, registran motilidades de 70% (Arriaga *et al.*, 2014) hasta 79.87% (Martinez *et al.*, 2015) y 75% de motilidad en llamas (Berland *et al.*, 2011), la desventaja es que este método de obtención es netamente experimental y solo es justificable cuando los testículos sean de animales genéticamente superiores muertos imprevistamente. La electroeyaculación es otro método que ofrece espermatozoides para la fecundación *in vitro* y es muy usado actualmente ya que también registra buenas motilidades; en llamas se tiene motilidades de 56.36% (Conde *et al.*, 2008) y 40% (Trasorras *et al.*, 2014).

Otro método de obtención de espermatozoides con buena motilidad para FIV es el método de desviación del conducto deferente, donde se registran motilidades de 50% aproximadamente (Pérez *et al.*, 2014; Pacompía, 2017; Arque, 2017)

En cuanto a espermatozoides provenientes de semen congelado se tiene el problema de que la motilidad es menos debido al proceso de congelación, pero aun así se ha tenido motilidades regulares. En alpacas se registran motilidades de 32% de motilidad post-descongelado en medio Tris-yolk-glycerol y 25% de motilidad para espermatozoides diluidos en medio de dilución AndroMed® post descongelados (Mamani, 2015).

2.1.1.3. Métodos de selección espermática.

La selección espermática permite la separación de los espermatozoides con morfología normal, una buena motilidad e integridad del material genético del resto de la población, así como de los diferentes componentes del eyaculado (Trasorras *et al.*, 2012)

- Técnica de gradiente de densidad.

El fundamento de esta técnica está en los principios básicos de la teoría de la sedimentación, los cuales derivan de la Ley de Stokes. Este método requiere de una solución cuya densidad aumenta desde la zona superior hacia la inferior. Los espermatozoides son colocados en la superficie y con la centrifugación son desplazados hasta un punto donde su densidad es igual a la de la gradiente. Como resultados los



espermatozoides intactos que poseen una mayor densidad se ubicarán en el fondo del tubo.

Dentro de los reactivos más empleados para preparar las gradientes se encuentra el Ficol y el Percoll®, siendo este último empleado en concentraciones de 90%, 45%, 30% o 22.5% en sus diferentes combinaciones (Palma, 2008).

Sin embargo, en sistemas de producción de embriones *in vitro* bovino, tratamientos con Percoll® sobre espermatozoides descongelados, fueron causantes de bajas tasas de clivaje y blastocistos, debido probablemente a la polivinilpirrolidona (PVP) libre en el percoll® (Avery y Greve, 1995).

- Técnica de Swim-up

El método de swim-up desarrollado consiste en separar los espermatozoides motiles de los no motiles, debido a la motilidad intrínseca de los espermatozoides, para ello una muestra de semen es colocada en el fondo de un tubo de ensayo junto con medio Sperm-TALP a 37 °C, en incubación y después de un tiempo de cultivo, permite que los espermatozoides motiles se desplacen hacia la superficie del tubo, de manera que si retiramos la parte superior habremos seleccionado los espermatozoides más capaces de fertilizar el ovocito (Parrish *et al.*, 1986). Un estudio realizado por Mendoza *et al.*, 2008, comparó estas dos técnicas, gradiente de Percoll y Swim-up, para utilizarlos en la fecundación *in vitro* de ovocitos de alpaca. Los resultados mostraron que, si bien los medios utilizados en las dos técnicas difieren entre sí, la separación por Swim-up fue más efectiva que la de gradiente de percoll con resultados en FIV de 42% de segmentación frente a 39% de segmentación del percoll. La única desventaja del Swim up es que requiere de varias muestras de semen.



2.1.1.4. Capacitación espermática *in vitro*.

Diferentes componentes como la albúmina sérica bovina (BSA) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) permiten la liberación de los agentes incapacitantes como el colesterol de la cabeza del espermatozoide. La heparina es otro componente comúnmente empleado para desencadenar la capacitación *in vitro* en bovinos, que finalizará con la correcta reacción acrosómica y penetración en el ovocito (Herradón *et al.*, 2007).

Otros componentes capacitantes utilizados es la solución de PHE (Penicilamina, hipotaurina y epinefrina) como estimulante de la motilidad espermática (Gordon y Lu, 1990).

También se ha encontrado que el uso de la catecolamina adrenalina y la hipotaurina incrementan la penetración (Palma, 2008).

2.1.1.5. Concentración espermática para FIV.

La concentración espermática también juega un rol importante para realizar la fecundación *in vitro* y la cantidad de espermatozoides depende tanto de método de colecta del semen como el estado del semen (fresco, refrigerado y congelado). En llamas para procesos de fecundación *in vitro* se llegaron a registrar concentraciones de 19.2 y 20.10 millones de espermatozoides por mL mediante electroeyaculación (Conde *et al.*, 2008; Trasorras *et al.*, 2014), mientras que en alpacas se tiene concentraciones de 105 y 190 millones de espermatozoides por mL (Martinez *et al.*, 2015; Arriaga *et al.*, 2014) mediante sección de colas de epidídimo de animales beneficiados en camal, el único problemas es el bajo porcentaje de motilidad; en tanto colectas con vagina artificial resultan concentraciones de 13.44 millones de espermatozoides por mL (Málaga, 2015), y mientras que con semen congelado se tienen concentraciones de 66.5 millones de espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo (Mellisho *et al.*, 2014; Mamani, 2015). Otro método que brinda buenas concentraciones de espermatozoides es el método

de desviación de conducto deferente que registran concentraciones de 25.53 y 40.49 millones de espermatozoides por mL tanto para alpacas y llamas (Pérez *et al.*, 2014).

2.1.1.6. Determinación de la concentración espermática en cámaras.

Se define como concentración espermática a la cantidad de espermatozoides que se encuentran en una unidad de volumen. Existen diferentes tipos de cámara para el recuento de espermatozoides. Todas fueron desarrolladas para el recuento hemocitométrico: Neubauer, Thoma, Thoma neu, Bürker-Türk/Türk, Fuchs-Rosenthal. Las más conocidas para la determinación del número de espermatozoides son las de Neubauer (Figura 01) y Thoma (Thoma neu). El principio de la determinación de la concentración espermática está establecido por el recuento de los espermatozoides de una muestra de semen diluido bajo condiciones estandarizadas. El mismo tiene en cuenta la superficie y la altura de la cámara como así también el grado de dilución al que se sometió la muestra de semen (Palma, 2008).

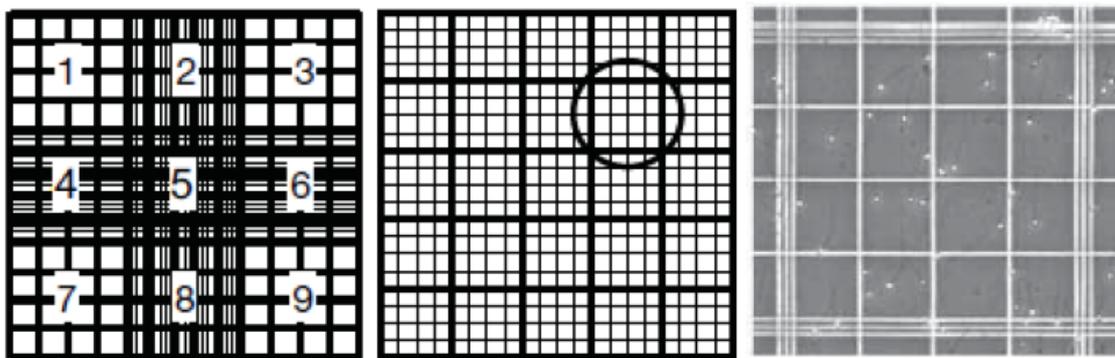


Figura 1. Ampliaciones sucesivas de la cámara de Neubauer. El recuadro 5 (retículo de Tomas) se ve amplificado en el esquema central (1 mm²) que a su vez indica un círculo que se amplifica nuevamente a la derecha para realizar el recuento (0,2 mm²). (World Health Organization, 2010).

2.1.1.7. Medios de fecundación *in vitro*.

El medio empleado debe ser capaz de proporcionar al ovocito maduro y al espermatozoide capacitado un entorno que garantice la fecundación. El medio albúmina lactato piruvato de Tyrode (TALP), es una preparación de Tyrode modificada que



contiene 25 mM de bicarbonato de sodio y albúmina de suero bovino (0.6%). El medio Tyrode/albumina se modifica también con cantidades variables de fuentes de energía de lactato de sodio y piruvato de sodio. Las concentraciones óptimas de estas fuentes de energía parecen ser 10 mM de lactato y 10 mM de piruvato en presencia de 5.6 mM de glucosa. Cuando se usa TALP como medio de fecundación, la BSA se utiliza como fuente de proteína.

En camélidos sudamericanos, el medio Fert-TALP es el más utilizado, sin embargo, existen distintas formas de fecundación, en cuanto a la cantidad de medio por ovocitos madurados. En llamas, después de la maduración *in vitro*, ovocitos maduros fueron colocados en gotas de 50 μ L de Fert-Talp (Morton *et al.*, 2008). También se suele utilizar microgotas de entre 1 y 5 ovocitos por gota de medio entre 45 y 50 μ L (Conde *et al.*, 2008; Ayuque y Justiniano, 2013; Trasorras *et al.*, 2014)

En alpacas también se utiliza microgotas de 45 μ L con 10 ovocitos (Mellisho *et al.*; 2014 Martínez *et al.*, 2015; Mamani, 2015; Pérez *et al.*, 2017), aunque se registran proporciones de más de 10 ovocitos por gota de medio (Huanca *et al.*, 2014). Este tipo de forma de plaqueo generalmente se hace en placas Petri de 35mm x 15mm y las gotas son cubiertas por aceite mineral.

Otra forma de plaqueo es en placas multipocillos. En donde se depositan medio de fecundación en un volumen de 500 μ L con una cantidad de ovocitos de entre 20 y 50 ovocitos maduros (Málaga, 2015)

2.1.1.8. Relación ovocito/espermatozoide en el co-cultivo FIV.

La relación ovocitos/espermatozoides es importante durante la fecundación *in vitro*, ya que se ha podido establecerse que, si el número de células espermáticas es demasiado bajo en relación con el número de ovocitos, obtendremos resultados de



fecundación pobres y si, por el contrario, el número de células espermáticas es demasiado alto se producen el fenómeno de poliespermía (Saeki *et al.*, 1990).

Independientemente del medio de fecundación utilizado, la mayor parte de los protocolos de fecundación *in vitro*, utilizan entre 0.5 y 3.5 millones de espermatozoides/mL y el co-cultivo con los ovocitos madurados *in vitro*, se lleva a cabo en microgotas de 50 uL. que contienen entre 5 y 10 ovocitos (Del Campo *et al.*, 1994; Del Campo *et al.*, 1995; Gómez *et al.*, 2002; Conde *et al.*, 2006; Ratto *et al.*, 2007; Conde *et al.*, 2008; Gamarra *et al.*, 2008; Mendoza *et al.*, 2008; Machicado *et al.*, 2009; Berland *et al.*, 2011).

La presencia de las células de los cúmulos en los ovocitos co-cultivados con los espermatozoides, incrementan los porcentajes de fecundación. Estos incrementos son debidos a que el cúmulo induce los mecanismos de capacitación espermática, facilitando la interacción del espermatozoide y la superficie de la zona pelúcida. (Cox *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1995).

En diversos trabajos de investigación realizados se ha alcanzado tasas de fecundación o clivaje relativamente variables con concentraciones menores usando semen fresco; correspondientes a valores como 0.1 millones de espermatozoides/mL con 27.1% de tasa de clivaje (Gamarra *et al.*, 2008), 0.5 millones por/ml con 38.64% (Málaga, 2015), 2 millones por mL con 74.2% utilizando distintas concentraciones de gonadotropinas (Pacompiá, 2017), 4 millones de espermatozoides/mL con 30.6% usando distintas concentraciones de FSH, LH y eCG en el medio de maduración (Quispe, 2018), 5 millones de espermatozoides/mL con tasas de 49.41% (Arque, 2017). También esta variabilidad en las tasas de clivaje se debe a que muchos autores utilizan un volumen determinado de medio capacitador con espermatozoides, en base a concentraciones



determinadas antes del proceso FIV con tasas de clivado de 46.2%, 48%, 27.5% (Arriaga *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2015; Pérez *et al.*, 2017). Mientras que en FIV utilizando espermatozoides provenientes de semen congelado, se tiene concentraciones de 10 millones de espermatozoides/mL en un volumen de 5 μ l con 37% y 35% de clivaje usando 2 métodos de selección espermática (Swim-up y Washing) (Mellisho *et al.*, 2014). Esto también se manifiesta con concentraciones altas para valores como de 4 millones de espermatozoides/mL con 36% (Trasorras *et al.*, 2014) y 2-3 millones de espermatozoides/mL con 29% de clivaje utilizando gametos de epidídimo (Del campo *et al.*, 1994).

2.1.1.9. Tiempo de fecundación *in vitro*.

El tiempo empleado para la fecundación de los ovocitos, generalmente se encuentra en 18 horas, tomando como referencia el tiempo empleado en bovinos. Este tiempo puede ser mayor o menor siempre y cuando se tomen en cuenta la concentración espermática y sucesos como presencia de poliespermia (Lorenzo, 1992; Bravo *et al.*, 1996). Sin embargo, en llamas se utilizan tiempos de fecundación de 24 horas, con buenas tasas de segmentación, utilizando gametos de animales vivos (Conde *et al.*, 2008; Berland *et al.*, 2011; Trasorras *et al.*, 2014).

2.1.2. Cultivo de embriones *in vitro* para evaluar clivaje.

2.1.2.1. Medios de cultivo embrionario *in vitro*.

Los medios de cultivo para embriones más empleados son el medio SOFaa y KSOMaa, la suplementación de estos medios con aminoácidos, permiten aumentar el desarrollo embrionario durante la división, regular el incremento o disminución del volumen celular, y favorecer el desarrollo embrionario con miras a su implantación. El suero al ser una mezcla compleja de biomoléculas es más beneficioso durante el desarrollo embrionario desde el estadio de mórula en adelante (Palma, 2008).



2.1.2.2. Criterios de clasificación y evaluación de la tasa de clivaje.

La evaluación del clivaje se puede dar en dos aspectos: uno cuantitativo y otro cualitativo. En el aspecto cuantitativo, se toma el número de cigotos (2, 4 y 8 divisiones o blastómeros) que desarrollan en los diferentes momentos del cultivo, sobre el número de cigotos cultivados para la maduración o divididos el día 1 o 2 después de la fecundación FIV, expresado en porcentaje (Palma, 2008).

Aunque los tiempos de evaluación de la división (clivaje) varían dependiendo de factores como el tipo de semen empleado en la fecundación *in vitro*, generalmente la evaluación se realiza a las 48 horas después del FIV en un medio de CIV. Evaluaciones de las divisiones de 48 horas muestran tasas de clivaje de 27.5% (Pérez *et al.*, 2017), 30.6% (Quispe, 2018), 38.64% (Málaga, 2015), 48% (Martinez *et al.*, 2015), y 49.41% (Arque, 2017), también se tienen datos de clivajes de 19.8% (Huanca *et al.*, 2014) y 46.2% (Arriaga *et al.*, 2014) con tiempos de 72 horas CIV en alpacas mientras que cigotos fecundados con espermatozoides congelados muestran tasas de clivajes de 27.1% (Gamarra *et al.*, 2008), 36.82% (Mamani, 2015) a las 72 horas de clivaje. En llamas por lo general el clivaje se realiza en 48 horas brindando tasas de clivaje de 36% (Trasorras *et al.*, 2014), 42.2% (Conde *et al.*, 2008), 51% (Ayuque y Justiniano, 2013) y 65.3% (Berland *et al.*, 2011).

2.1.3. Evaluación de la poliespermia.

2.1.3.1. Poliespermia.

La entrada de un único espermatozoide al interior del ooplasma del ovocito se le conoce como monospermia, que es una característica esencial para los procesos reproductivos en los mamíferos, mientras que la entrada de más de un espermatozoide al ovocito se le considera un proceso patológico denominado poliespermia o polispermia (Hunter, 1991) dicha patología es contraproducente en las tasas de fecundación *in vitro*.



A diferencia de la situación *in vivo*, en la cual la proporción ovocito:espermatozoide es cercana a la unidad (Hunter, 1993), *in vitro* los ovocitos son expuestos a un elevado número de espermatozoides capacitados dando lugar en muchos casos a penetraciones polispermicas (Nagai *et al.*, 1984; Coy *et al.*, 1993).

La poliespermia en mamíferos tiene como consecuencia el desarrollo fallido del cigoto. Cuando se presenta un nacimiento en mamíferos a partir de un embrión polispermico y éste se caracteriza por presentar severas malformaciones y múltiples anomalías (Kjaer *et al.*, 1997; Nolting *et al.*, 2002)

También se sabe que otra variable que contribuye al aumento de la poliespermia en mamíferos, es la maduración de los ovocitos, donde los ovocitos inmaduros tienden a presentar mayor incidencia de poliespermia que ovocitos maduros (Ducibella y Buetow, 1994).

2.1.3.2. Gránulos corticales.

Un punto importante a considerar en el problema de la poliespermia es el papel que juegan los gránulos corticales. Éstos son unos organelos pequeños, localizados en la periferia del ovocito maduro que reaccionan al penetrar un espermatozoide, liberando su contenido por exocitosis al espacio perivitelino, produciendo el bloqueo en la zona pelúcida y evitando que entren más espermatozoides (Hoodboy y Talbot, 1994). Durante la maduración, se da la redistribución de los organelos internos del ovocito, por lo que lograr una distribución normal de los gránulos corticales durante la IVM puede ayudar a prevenir la poliespermia (Saavedra, 2009).

Estas organelas son específicas de los ovocitos de mamíferos no fecundados y consideradas como unas de las más importantes dentro del citoplasma por su implicación en la reacción de zona para prevenir la poliespermia (Guraya, 1982).



2.1.3.3. Tinción fluorescente Hoechst 33342.

El Hoechst es un colorante fluorescente de ADN empleado en la microscopía de fluorescencia y en la separación celular por citometría de flujo (FACS). Por su capacidad de tinción de ADN, se emplea para visualizar núcleos y mitocondrias. En donde habitualmente existen dos bisbenzimidazoles muy relacionados: Hoechst 33258 y Hoechst 33342, ambos colorantes son excitados por luz ultravioleta con una longitud de onda cercana a los 350 nm y emiten fluorescencia azul/cíán con un máximo de emisión de alrededor de 461 nm. El Hoechst puede usarse tanto en células vivas como fijadas, y se emplean a menudo en sustitución de otro tinte de ácidos nucleicos (Hawley y Robert, 2004).

Tales colorantes se almacenan sin diluir a 4°C y se protegen de la exposición prolongada a la luz. Para la tinción inmunofluorescente de células vivas y visualización nuclear, primero se diluye la solución de Hoechst 33342 a 5-10 µg/mL en medio completo inmediatamente antes de usar. Luego se agrega la solución de Hoechst 33342 a cada muestra y se incuba a 37°C durante 30 a 60 minutos. El tiempo de tinción requerido depende del tipo de célula, luego se retira la solución de Hoechst de las células al final del período de incubación y se agrega 1x de PBS. Las células también pueden analizarse sin lavarse, pero esto puede aumentar el fondo del tinte no unido, por último, se realiza la lectura de la muestra (INVITROGEN, 2005).

2.1.3.4. Criterios de clasificación y evaluación de la tasa de poliespermia.

Aún no existe algún protocolo para evaluar la tasa de poliespermia de ovocitos de alpaca fecundados *in vitro* mediante tinción de fluorescencia, sin embargo, existen investigaciones en porcinos y camellos que cuentan con criterios de evaluación con dicha tinción, en camellos por ejemplo los ovocitos coloreados con Hoechst (figura 02) cualitativamente se clasifican como fertilizados (cabeza espermática con o sin

descondensación dentro del ooplasma y presencia de pronúcleos masculinos y/o femenino), no fertilizados (sin signos de penetración de espermatozoides), polispérmicos (con más de una cabeza espermática en el ooplasma o más de dos pronúcleos) y degenerados (con cromatina dispersa, degenerada, invisible o con vacuolas) (Wani, 2008).

Cuantitativamente en porcinos la tasa de poliespermia se calcula mediante el conteo de ovocitos con más de 2 pronúcleos dividido con la cantidad total de ovocitos inseminados *in vitro* multiplicado por 100 (Benavides, 2005)

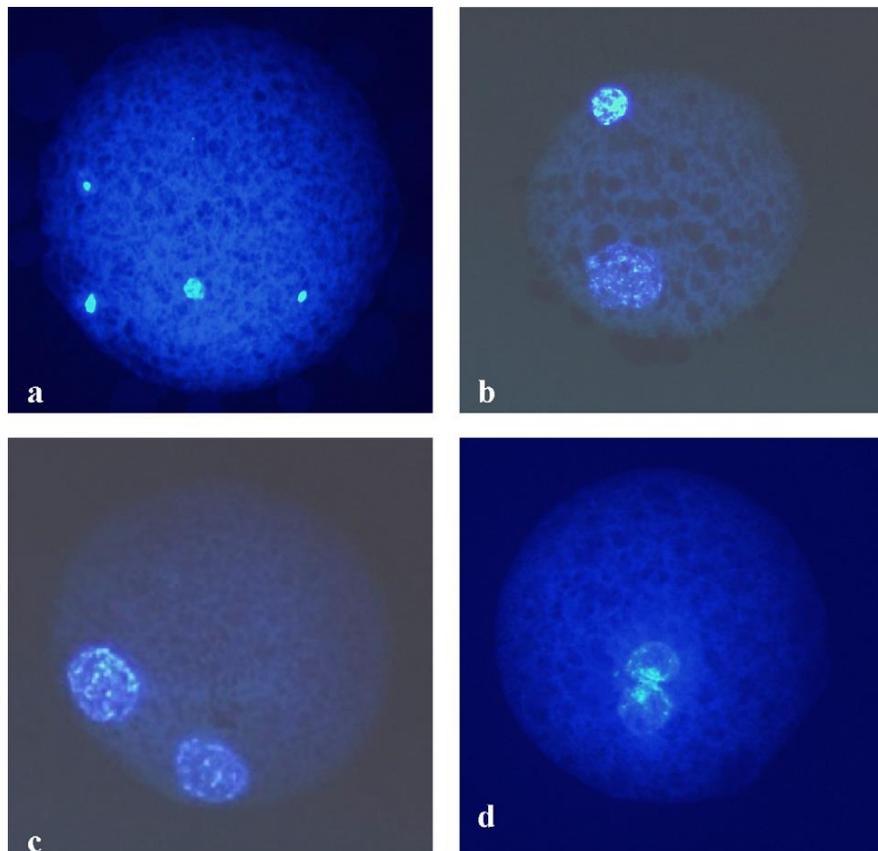


Figura 2. Ovocitos de camello fecundados *in vitro* con tinción Hoechst 33342: (a) ovocito con un espermatozoide en ooplasma y primer y segundo cuerpos polares visibles; (b) ovocito con un pronúcleo femenino y condensación de cromatina de esperma; (c) ovocito con pronúcleos masculinos y femeninos y (d) ovocitos con pronúcleos masculinos y femeninos singámicos. (Wani et al., 2008)

La poliespermia es un problema común y aún sin resolver en los sistemas de fecundación *in vitro* sobre todo en la especie porcina (Coy *et al.*, 2005; Hao *et al.*, 2006). Algunos autores indican que durante la fecundación *in vivo* existe un 5% a 35% de



poliespermia (Hunter, 1973), mientras que en ovocitos madurados y fecundados *in vitro* puede alcanzar un 65% (Wang *et al.*, 1998).

Ovocitos porcinos fecundados *in vitro* con espermatozoides de semen fresco fueron suplementados con acetato tetradecanoylphorbol para reducir la poliespermia en donde dieron como resultado una tasa máxima de 58.1% con 1 uM y una tasa mínima de 10% con 10 uM de acetato tetradecanoylphorbol, frente a su resultado control de 32.4% (Benavides, 2005), otros estudios revelan que utilizando la osteopontina en la reducción de poliespermia de ovocitos porcinos fecundados en FIV revelan tasas de 38.8%, 32.9%, 27.2%, 20.8% y 16.4% usando concentraciones de 0.0, 0.001, 0.01, 0.1 y 1.0 ug/mL de osteopontina respectivamente (Hao *et al.*, 2006).

También existe un estudio donde se utilizó EGF en el proceso de MIV, donde las tasas de poliespermia fueron reducidas de 47,4% a un 36,2% (Martínez, 2002). Otro estudio enfocándose en utilizar medios modificados en el proceso MIV como el medio Waymouth y TCM 199 modificados y con distintas dosis de espermatozoides registraron tasas de 42.86%, 52.73%, 70.11% y 91.23% utilizando concentraciones de 10, 50, 250, y 500 x10³ espermatozoides/mL respectivamente, mientras que con el medio TCM 199 se tuvieron tasas de 44.19%, 57.50%, 80.7% y 91.6% utilizando las mismas concentraciones correspondientemente (Romar *et al.*, 1999)

En vacunos las tasas de poliespermia no supera un 10% (Iwasaki *et al.*, 1989; Iwasaki y Nakahara, 1990; Kawarsky *et al.*, 1996), por ejemplo, un estudio donde se utilizó ovocitos de ovarios de vacas beneficiadas en camal fueron mantenidos a temperaturas de 4 y 38°C y luego fecundados con espermatozoides de semen congelado y a la evaluación con tinción de orceína acética al 1%, registraron tasas de poliespermia de 9 % y 2 % para cada temperatura de mantención (Risopatrón *et al.*, 1991).



Otro estudio en donde se trabajó con heparina y distintas concentraciones de espermatozoides registraron tasas de poliespermia de 0%, 10% y 15% con concentraciones de 0.5, 1 y 2 x10⁶ espermatozoides/mL y con 10 µg/mL de heparina (Salgado *et al.*, 2004), por tal motivo, las tasas de poliespermia son bastante bajas en vacunos, tanto que no comprometen las tasas de fecundación, por ello no justifica evaluar este parámetro en esta especie.

Mientras que en camellos, la especie más cercana a la alpaca, reportan tasas de poliespermia de 5% en ovocitos fecundados *in vitro*, y tasas de 3 y 2% con suplementación de cafeína en el proceso MIV (Fathi *et al.*, 2014), también se hicieron tinciones Hoechst a ovocitos fecundados con espermatozoides obtenidos de epidídimos de camellos beneficiados en camal que fueron refrigerados a 4°C, diluídos en Tris–tes, y fecundados a distintos tiempos (2, 4, 6, 8 días), donde las tasas de poliespermia fueron de 3%, 4%, 7%, 5% y 7% respectivamente mientras que espermatozoides diluidos con Tris–lactose fueron 3%, 3%, 5%, 3% y 2% de poliespermia respectivamente (Wani *et al.*, 2008)

2.2. ANTECEDENTES EN LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS.

La primera fecundación *in vitro* en alpacas, se realizó con espermatozoides epididimarios diluidos en solución TRIS fructosa con 10% de glicerol, en donde la dosis de inseminación utilizada fue de 10 millones de espermatozoides por mililitro, donde se obtuvieron tasas de 27.1% de segmentación, 8% de mórulas y 3% de blastocistos eclosionados (Gamarra *et al.*, 2008), también se realizaron trabajos con semen fresco de llamas, en la producción de embriones de llamas *in vitro* obteniendo tasas de 17%, (16/94) de blastocistos expandidos y recientemente producido un 15% (5/33) de blastocistos expandidos después del cultivo en medio DMEM-F12 (Conde *et al.*, 2008).



Desde los primeros experimentos en maduración y fecundación *in vitro* en camélidos sudamericanos, los ovarios de alpacas y llamas obtenidos de hembras beneficiadas en el camal han sido una fuente importante para la recuperación de complejos ovocito-cúmulo (CCOs), facilitando gran disponibilidad de ovocitos para la investigación en la estandarización de protocolos de maduración y fecundación *in vitro* (Del Campo *et al.* 1992; Del Campo *et al.*, 1994; Ratto *et al.*, 1999; Ruiz *et al.* 2007; Mendoza *et al.* 2008; Gamarra *et al.* 2008; Huanca *et al.*, 2009).

En cuanto al desarrollo embrionario obtenido por FIV, se observó que los porcentajes de segmentación y blastocistos aumentan gradualmente fertilizando ovocitos madurados *in vitro*, por un tiempo de 38 horas (Huanca *et al.*, 2009)

El manejo de semen es otro factor influyente en las tasas de fecundación de la producción de embriones *in vitro*, debido a que el semen de alpaca es bastante viscoso y filante que en varios estudios utilizan la colagenasa para reducir su viscosidad y las tasas de división (formación de cigotos) a las 48 horas de la fecundación fueron 56% y 50% con y sin agentes capacitantes (heparina, penicilamina e hipotaurina), obteniendo tasas de 40.8% y 42.2% de división a los dos días y 35% y 47% de blastocistos a los 8 días con y sin agentes capacitantes (Mendoza *et al.*, 2008; Gamarra *et al.*, 2008). Demostrando que la colagenasa no afecta la capacidad fecundante del semen y que es posible producir embriones de llama por FIV con semen fresco.

En cuanto al empleo de semen congelado para FIV de alpacas, se congelaron espermatozoides epididimarios previamente diluidos en una solución de TRIS-Fruktosa con 10% de glicerol, luego, estos pellets conteniendo los espermatozoides fueron descongelados y centrifugados en gradiente de Percoll y resuspendidos en medio FERT-TALP suplementado con penicilamina, hipotaurina, epinefrina (PHE) y heparina. Los ovocitos madurados *in vitro* por 30 horas fueron inseminados con una concentración de



10×10^6 espermatozoides /gota de 100 mL de FERT-TALP, obteniéndose así 27.1% de segmentación a las 72 horas, 8.0% de mórulas a los 5 días y 3% de blastocitos eclosionados a los 7 días de cultivo embrionario, siendo el primer y único logro en FIV de ovocitos de alpacas utilizando espermatozoides congelados (Gamarra *et al.*, 2008).

Por otro lado, se compararon los métodos de gradiente de Percoll y Swim up para la recuperación de espermatozoides epididimarios y utilizarlos en la fecundación *in vitro* de CCOs de alpaca aspirados de ovarios obtenidos en el camal; tales epidídimos fueron separados de los testículos y suspendidos en SPERM-TALP luego fueron centrifugados en SPERM-TALP y finalmente sometidos a uno de los dos tratamientos siguientes: centrifugados en una gradiente de Percoll o colocados en la estufa por 45-60 minutos con una inclinación de 45° (swim up), por último los ovocitos previamente colocados en FERT-TALP fueron inseminados con una concentración final aproximada de $2.5 - 3.5 \times 10^6$ espermatozoides/mL y los resultados obtenidos fueron 39.0% y 42.3% de segmentación y 7.3% y 6.9% de blastocitos para Percoll y Swim-up respectivamente, demostrando por primera vez que es posible utilizar el método de “swim-up” en la FIV de ovocitos de alpacas (Mendoza *et al.*, 2008).

Actualmente la utilización de espermatozoides provenientes de machos vivos con desviación de conducto deferente brinda mejores resultados en la tasa de fecundación *in vitro* de ovocitos de alpacas, los resultados que ofrecen es que evita la acción de enzimas proteolíticas que intenten licuefactar el coágulo del eyaculado para un mejor manejo espermático (Quintano, 2002; Pérez *et al.* 2014).



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva del Centro de Innovación y Producción (CIP) Quimsachata, el cual pertenece a la Estación Experimental Agraria Illpa – Puno, ubicado a 4200 metros de altura en el distrito de Santa Lucía, provincia de Lampa en el departamento de Puno, Perú (15° 8 41'39'' Latitud Sur, 70°36'24'' Longitud Oeste) (SENAMHI, 2012).

3.1.1. Población

La población fueron los ovocitos madurados *in vitro* de ovarios de alpacas Huacaya adultas no preñadas beneficiadas en mataderos de los distritos de Nuñoa y Ayaviri del departamento de Puno.

3.1.2. Muestra

El método y el tamaño muestral fueron considerados por conveniencia (no probabilístico). De un total de 315 ovarios de alpacas beneficiadas, se obtuvieron 2817 ovocitos maduros de alpaca entre las categorías A y B para la fecundación *in vitro*.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Material experimental

- Recolección de ovarios

Los ovarios fueron recolectados de alpacas hembras beneficiadas en camales. Los animales fueron hembras adultas entre preñadas y vacías de raza Huacaya y/o Suri con una condición corporal regular y buena.

- Fuente de obtención de semen



El semen fresco fue colectado de 2 machos adultos de raza Huacaya del plantel de reproductores del laboratorio de colección del CIP Quimsachata y las pajillas de semen congelado fueron de los mismos machos, congeladas en el mes de julio del mismo año con motilidades entre 20% y 30% y concentraciones de entre 25 a 120 millones de espermatozoides por mL, proporcionadas por el mismo laboratorio.

3.2.2. Material de laboratorio

Material de vidrio

- Probetas (500 mL)
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Beakers (250 mL)
- Frasco Pyrex (500mL)

Material de plástico

- Jeringas (1 y 20 mL)
- Tips (10; 200; 1000 μ L)
- Filtros millipore (22 μ m)
- Viales (0.2 y 2 mL)
- Tubos Falcon (15 y 50 mL)
- Placas petri grandes cuadrículadas (90x15mm)
- Placas mutipocillo (6 pocillos)

Reactivos



- Agua ultrapura (MillQ)
- Aminoácidos Esenciales (Sigma M5550)
- Aminoácidos No Esenciales (Sigma M7145)
- BSA Factor V (Sigma A4503-100G)
- BSA FAF (Sigma A6003-5G)
- Carbonato de Sodio (NaHCO_3 , Sigma S5761-500G)
- Cloruro de Calcio (CaCl_2 , Sigma C7902-500G)
- Cloruro de Magnesio (MgCl_2 , Sigma M2393-500G)
- Cloruro de Potasio (KCl; Sigma P5405-250G)
- Cloruro de Sodio (NaCl; Sigma S5886-1KG)
- Colorante HOECHST 33342 (bis-Benzimide trihydrochloride; Sigma-Aldrich)
- Estradiol (17- β , Sigma E2758-1G)
- Fosfato Ácido de Potasio (KH_2PO_4 ; Sigma P5655-500G)
- Fosfato Ácido de Sodio (NaH_2PO_4 , Sigma S5011-100G)
- FSH (Folltropin)
- Gentamicina (Sigma G1264-5G)
- Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, Sigma G1264-5G)
- Heparina (Sigma H3149-25KU)



- HEPES (Sigma H4034-100G)
- Hipotaurina (Sigma H1384-1G)
- L-Glutamina (Sigma G3126-100G)
- Percoll® (Sigma P1644-1L)
- Piruvato de sodio (Sigma P5280-25G)
- Rojo Fenol (Sigma P3532-25G)
- Sulfato Magnesio Hepta hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Sigma 230391-500G)
- TCM – 199 (Sigma M7528)

3.2.3. Equipos de laboratorio

- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Calentador eléctrico de agua
- Centrifugadora
- Estereoscopio
- Equipo Baño maría
- Equipo de disección
- Incubadora CO_2
- Microscopio óptico



- Microscopio de fluorescencia
- Micropipetas Eppendorf (10, 200 y 1000 μ l)
- Platina térmica
- Tanque de nitrógeno líquido
- Termo portátil
- Vórtex
- Vagina artificial
- Maniquí de colecta

3.2.4. Indumentaria de laboratorio.

- Gorra descartable
- Mascarilla descartable
- Mandil
- Guantes de látex sin talco
- Botas descartables

3.3. METODOLOGÍA.

3.3.1. Fecundación *in vitro* de ovocitos de alpaca

3.3.1.1. Medios para FIV (Fertil-TALP y Sperm-TALP)

- El medio para FIV se preparó con los componentes utilizados por Bavister *et al.*
- La solución Stock del medio Fertil-TALP para ser utilizado se agregó componentes alicuotados que se mantenían congelados como el $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,



MgCl₂*6H₂O, lactato de Sodio, piruvato de Sodio, heparina, gentamicina y BSA fracción V en estado sólido liofilizado. Este medio se filtró mediante filtros Millipore de 0.22 µm en un volumen de 10 mL por sesión de FIV en un tubo Falcon. Todo el medio fue preparado dentro de la cámara de flujo laminar.

- Luego el medio Stock de Fertil-TALP se plaqueó en una placa, valga la redundancia, de 6 pocillos con un volumen de 500 µL y rotulado, para después ser dejado bajo equilibrio de gases dentro de la incubadora de CO₂ con un mínimo de 2 horas antes de la sesión de FIV. El resto de medio después del plaqueo sirvió para realizar lavados de ovocitos maduros después de la clasificación

- Por último, se preparó el medio Sperm-TALP para la capacitación de espermatozoides. Dicho medio se preparó con los componentes utilizados por Bavister *et al.*, compuesto por 100 mM de NaCl; 2 mM CaCl₂*2H₂O, 3.1 mM de KCl, 0.4 mM de MgCl₂*6H₂O, 0.3 mM de NaH₂PO₄*H₂O, 21.6 mM lactato de Na, 1 mM piruvato de Na, 25 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 0.3% (p/v) de BSA sin Acidos grasos y 25 µg/mL de gentamicina y se mantuvo bajo refrigeración a 5°C.

- Para convertirla a solución Stock se le agregó componentes alicuotados que se mantenían refrigerados como el CaCl₂*2H₂O, MgCl₂*6H₂O, lactato de sodio, piruvato de Sodio y gentamicina; más la adición de BSA fracción V en estado sólido liofilizado.

- Este medio se filtró mediante filtros de 0.22 µm y se colocó dentro de la incubadora de CO₂ para su estabilización hasta su utilización en la capacitación espermática. Este medio se preparó en volumen de 10 mL por sesión de FIV en la cámara de flujo laminar (Conde *et al.*, 2008; Ayuque y Justiniano, 2013; Trasorras *et al.*, 2014)

3.3.1.2. Obtención de espermatozoides de semen fresco y congelado.



- La colección del semen fresco de alpaca se realizó con maniquí, donde se utilizaron dos alpacas machos adultos de raza Huacaya de color blanco.
- Se preparó 2 vaginas artificiales, con temperaturas de 43°C y se montó en cada maniquí.
- Luego se soltó a los machos para que puedan montar dicho maniquí. Después de cada eyaculado, la vagina artificial fue retirada y llevada al laboratorio de manejo de semen para su evaluación (Bustanza, 2001).
- El semen colectado se mantuvo en baño María a 37 °C, luego se evaluó la motilidad para luego ser diluido en Steridyl (1.5 agua bidestilada: 1 dilutor) en un volumen aproximadamente de 1 mL en un tubo Falcon.
- Para el caso de muestras de semen congelado, se tomaron dos pajillas congeladas de los mismos animales (congelados con anterioridad) de 0.25 mL por una sesión de FIV y se descongelaron en baño maría a 38.5° con un mínimo de 30 segundos.
- Para utilizar muestras de semen fresco en una sesión de FIV se consideraron solo muestras con motilidades por encima de 40%. Mientras para el caso de semen congelado solo se consideraron pajillas congeladas con motilidades por encima de 20% y con concentraciones por encima de 40 millones de espermatozoides por mL.

3.3.1.3. Selección y capacitación de espermatozoides de semen fresco y congelado.

- La selección se realizó preparando la gradiente de Percoll con densidades de 45% y 22.5% (uno por encima del otro) en volúmenes de 500 µL dentro de un tubo Falcon de 15 mL en baño maría a 38.5°C
- Se colocó lentamente un volumen de 500 µL de la muestra de semen por encima de la columna de Percoll (45%:22.5%), tratando de que éste no se mezcle.



- Luego se llevó a cabo el proceso de centrifugación a 2500 rpm por un lapso de 15 minutos. Pasado ese tiempo se eliminó todo el sobrenadante, quedando solo un pequeño pellet formado en la base del tubo.

- Para la capacitación, el pequeño pellet formado por la centrifugación fue resuspendido en medio Sperm-TALP con la adición de 30 μL de PHE y 20 μL de heparina.

- Luego se realizó la segunda centrifugación a 1500 r.p.m por 5 minutos para separar los espermatozoides del medio Sperm-TALP, quedando así un pellet con espermatozoides capacitados.

- Por último, el pequeño pellet fue resuspendido en 500 μL de medio Fertil-TALP e incubado dentro de la incubadora hasta su co-cultivo con los ovocitos madurados (Palma, 2008).

3.3.1.4. Determinación de la concentración espermática para los tratamientos.

- La determinación de la concentración se realizó mediante la cámara de Neubäuer

- Para realizar este proceso, se tomó 10 μl del medio de espermatozoides capacitados y se diluyó en 990 μL para así tener una dilución de 1:100

- Luego se colocó 10 μL de la dilución en cada cámara y se llevó al microscopio a 40x donde se contó los espermatozoides.

- Para determinar la concentración total se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración Espermática Total} = \frac{\# \text{ de espermatozoides} \times 50 \times 100 \times 1000}{ml}$$



Dónde:

= La suma de espermatozoides según cuadrantes de la cámara

50 = Superficie contada en la cámara de Neubauer.

100 = Es el grado de dilución del semen.

1000 = transformación de mm³ a mL.

El resultado final se multiplica por la cantidad de eyaculado en mililitros (Palma, 2008).

- Una vez determinada la concentración espermática, se calculó el volumen ajustado (V_2) según la concentración de cada tratamiento mostrado en la tabla 1, Mediante la siguiente fórmula:

$$V_2 = \frac{C_2 \times V_1}{C_1}$$

Donde:

C_1 = Concentración espermática total de la muestra de semen fresco o congelado

V_1 = Volumen total del medio Fert-TALP (500 μ L)

C_2 = Concentración de acuerdo al tratamiento del estudio (tabla 1)

V_2 = Volumen final ajustado.

3.3.1.5. Evaluación y selección de ovocitos madurados *in vitro* para FIV.

- Simultáneamente a la selección y capacitación espermática. Se evaluó la maduración de los ovocitos cultivados durante 36 horas, mediante la observación morfológica, teniendo en cuenta la presencia del 2 corpúsculo polar y el grado de

compactación del ovocito. El equipo que se utilizó para esto fue un estereoscopio óptico con platinas atemperadas a 38.5°C

- Luego de la evaluación, cada grupo de ovocitos madurados, fueron aspirados y lavados del medio de maduración mediante pipeteo en una placa Petri (60x15mm) en 4 gotas (60 μ L) seriadas de medio Fertil-TALP preparado. También se desnudó parcialmente todos los ovocitos mediante el pipeteo constante por gota.

- Por último, los ovocitos maduros seleccionados, fueron depositados en grupos de entre 20 y/o 25 por pocillo de 500 μ L de Fertil-TALP (modificado).

3.3.1.6. Fecundación *in vitro* de ovocitos madurados.

- En esta parte, con la ayuda de una micropipeta se inoculó el volumen final ajustado de espermatozoides capacitados en los pocillos de los ovocitos trasladados al medio Fertil-TALP (co-cultivo). La cantidad de este volumen y el tiempo FIV dependió de la sesión FIV acorde con los tratamientos de la tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos para FIV según concentración, estado de semen y tiempo de FIV.

N°	Tiempo FIV	Tratamientos	
		Estado de semen	Concentración ($\times 10^6$ espermatozoides/mL)
1	18horas	Semen Fresco	0.5
2	18horas	Semen Fresco	1
3	18horas	Semen Fresco	1.5
4	18horas	Semen Congelado	2
5	18horas	Semen Congelado	4
6	18horas	Semen Congelado	6
7	24horas	Semen Fresco	0.5
8	24horas	Semen Fresco	1
9	24horas	Semen Fresco	1.5
10	24horas	Semen Congelado	2
11	24horas	Semen Congelado	4
12	24horas	Semen Congelado	6

FUENTE: Elaborado por el equipo de trabajo.



3.3.2. Tinción con colorante de fluorescencia Hoechst 33342 y tasa de poliespermia

- La tinción se realizó después del periodo de fecundación *in vitro* (18 y/o 24 horas)
- Se procedió a preparar medio de lavado en base a D-PBS x1 sin BSA.
- Luego se aspiró los ovocitos de cada pocillo y se hizo el correspondiente lavado en 4 gotas de medio de lavado (D-PBS x1)
- Se colocó una gota de 15 μ L junto con los cigotos del FIV en un portaobjeto desengrasado y se le añadió 10 μ L del colorante HOECHST 33342 (1mg/mL).
- Luego se dejó a temperatura ambiente por un periodo de 20 minutos para la fijación y se procedió a realizar el conteo de cigotos utilizando el sistema CASA de fluorescencia que consta de un microscopio Zeiss AxioLab AndroVision® con opción de fluorescencia (Viabilidad Hoechst 33342) y un sistema de software AndroVision® software (INVITROGEN, 2005).
- Los parámetros de emisión de luz para excitar el fluorocromo fue de 352nm y los criterios de evaluación de poliespermia fueron los siguientes: Cigotos con más de una cabeza espermática descondensada y Cigotos con más de 2 pronúcleos (Wani, 2008). Todo el proceso de tinción se realizó en un ambiente aislado de fuentes de luminosidad intensa.

- La tasa de poliespermia se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de Poliespermia (\%)} = \frac{C > 2PN + C > 1CED}{C.F.} \times 100$$

Donde:

C >2PN: Cigotos con más de 2 pronúcleos.

C >CED: Cigotos con más de 1 cabeza espermática descondensada.



C.F.: Número total de cigotos fecundados.

3.3.3. Cultivo *in vitro* para evaluación de clivaje

3.3.3.1. Medio de cultivo (SOF).

- El medio SOF se preparó con los componentes utilizados por Holm *et al.*, con ligera modificación y fueron los siguientes reactivos: 107.7 mM de NaCl, 7.2 mM de KCl, 1.2 mM de KH_2PO_4 , 25.0 mM de NaHCO_3 , 1.5 mM MgSO_4 , 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rojo fenol, 1.8 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5.4 mM de DL-lactato de Na, 7.3 mM de piruvato de Na, 0.2 mM de L-glutamina, 3 mg/mL de BSA libre de ácidos grasos, 45 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de aminoácidos esenciales, 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de aminoácidos no esenciales, 10 ng/mL de EGF, 0.3 mM de ácido cítrico, 2.8 mM de Myo-inositol, 2% de SFB y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina.

- Para convertirlo en solución stock se le adicionó componentes refrigerados como el $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, lactato de Sodio, piruvato de Sodio, L-glutamina, EGF, ácido cítrico, myo-inositol, SFB, BEN amino ácidos esenciales, MEN amino ácidos no esenciales y gentamicina, así como la adición de componentes sólidos como el BSA sin ácidos grasos. Este medio se filtró mediante filtros Millipore de 0.22 μm dentro de un tubo Falcon de 15 mL.

-Luego se realizó el plaqueo del medio en una placa de 6 pocillos con un volumen de 500 μL de medio SOF y su rótulo correspondiente. Luego la placa con el sobrante de SOF fueron llevados dentro de la cámara de CO_2 con un tiempo de 2 horas de anticipación al tiempo FIV realizado (18 y/o 24 horas) (Palma, 2008).

3.3.3.2. Cultivo de los cigotos.

- Después del periodo de fecundación (18 y/o 24 horas), los cigotos fueron aspirados de cada pocillo y lavados en 4 gotas seriadas de medio SOF, en una placa Petri



(60x15mm), con el fin de quitar los restos de espermatozoides y lavarlos del medio FERTALP.

- Luego la placa de CIV fue colocada dentro de la incubadora a 38.5°C con 6% de CO₂ y humedad alta (modificado)

3.3.3.3. Tiempos de cultivo *in vitro* para clivaje.

- Para el clivaje de los cigotos fecundados con espermatozoides provenientes de semen fresco, el tiempo de evaluación se hizo a las 48 horas (Pérez *et al.*, 2017) y para los cigotos fecundados con espermatozoides de semen congelado el clivaje se realizó a las 72 horas (Mellisho, 2014) con un cambio extra de cultivo a las 48 horas.

- Los cigotos fueron lavados con medio Fluido Ovidultal Sintético (SOF) y fueron cultivados en 500 µL de SOF, entre 20 a 25 cigotos durante 48 horas para los ovocitos fecundados con espermatozoides de semen fresco y 72 horas para ovocitos fecundados con espermatozoides de semen congelado en incubadora de CO₂ mantenidos con 6.1% de CO₂, 5% de O₂, a 38.5 °C con alta humedad.

3.3.3.4. Evaluación de la división embrionaria (clivaje)

- La evaluación de la división embrionaria se realizó observando las características morfológicas de los cigotos cultivados en CIV durante 48 y 72 horas dependiendo del origen de los espermatozoides utilizados en el FIV (semen fresco o congelado) (Palma, 2008).

- Por cada pocillo de cultivo se contaron los cigotos que tenían entre 2, 4 y 8 blastómeros (divisiones) y para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$Tasa\ de\ Clivaje\ \% = \frac{\# Cigotos\ divididos}{\# Presuntos\ Cigotos} \times 100$$



3.3.4. Análisis estadístico.

Los datos de las variables en estudio fueron analizados mediante la prueba estadística de Ji cuadrado (Plackett, 1983).

$$X^2 = \sum \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Para tasa de Clivaje:

X^2 = población observable de ovocitos fertilizados

O_i = ovocitos fertilizados observados

E_i = ovocitos fertilizados esperados

Para tasa de Poliespermia:

X^2 = población observable de ovocitos con poliespermia

O_i = ovocitos con poliespermia observados

E_i = ovocitos con poliespermia esperados

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. TASA DE CIGOTOS FERTILIZADOS *IN VITRO* CON SEMEN FRESCO Y CONGELADO EN DOS TIEMPOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES ESPERMÁTICAS.

Tabla 2. Tasa de clivaje de ovocitos de alpaca fertilizados con semen fresco

Estado de Semen	Tiempo FIV (Horas)	Concentración ($\times 10^6$ espermatozoides/mL)	Cigotos divididos	Cigotos Totales	Tasa de clivaje
Fresco	18	0.5	37	103	35.92%
		1	25	106	23.58%
		1.5	15	110	13.64%
	24	0.5	18	118	15.25%
		1	16	121	13.22%
		1.5	16	129	12.40%
Congelado	18	2	16	113	14.16%
		4	10	111	9.01%
		6	8	115	6.96%
	24	2	12	116	10.34%
		4	10	116	8.62%
		6	9	124	7.26%

a diferentes tiempos y concentraciones espermáticas.

($p \leq 0.05$)

La tabla 2, muestra los resultados de la fecundación *in vitro* de ovocitos fertilizados con semen fresco y congelado, en donde se encontraron tasas de 35.92% (37/103), 23.58% (25/106) y 13.64% (15/110) con concentraciones de 0.5, 1, 1.5×10^6 esperm. /mL respectivamente después de 18 horas de fecundación *in vitro*, en donde la concentración de 0.5×10^6 esperm. /mL fue la más alta dentro de todos los tratamientos de 18 horas FIV con semen fresco y que fue superior a Del Campo *et al.* (1994), quien tuvo tasas de 32% en sus primeros ensayos con FIV en llamas esto se debe a que utilizó una concentración mayor de espermatozoides (2-3 millones/mL) que probablemente produjeron mayores casos de poliespermia, también fue superior al de Gamarra *et al.* (2008) quien tuvo una tasa de segmentación de 27.1% usando espermatozoides congelados esto se debe a que Gamarra *et al.* (2008) utilizó una concentración aún más



mayor de espermatozoides (10 millones/mL) en un tiempo de 24 horas, lo que puede indicar que la poliespermia haya aumentado debido a dicha concentración y al tiempo prolongado de FIV, reduciendo así la tasa de fecundación, mientras que Quispe, (2018) quien tuvo su mayor tasa con 30.6% utilizando distintas concentraciones de hormonas en la maduración *in vitro* también fue superior debido al menor tiempo de FIV (12 Horas) aplicado, el cual un tiempo menor de FIV disminuye la probabilidad de que los espermatozoides lleguen a fecundar la mayor cantidad de ovocitos maduros.

Dicha tasa mayor encontrada en este trabajo de investigación, fue inferior en comparación con los datos de Mendoza *et al.* (2008) quien tuvo tasas de 42% y 39% usando Swim-up y Washing como métodos de selección de alpacas, esto debido a que Mendoza *et al.* (2008) colectaron espermatozoides de epidídimo, los cuales poseen una motilidad mayor que los que se obtienen por vagina artificial (Arriaga *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2015; Berland *et al.*, 2011).

También fue bastante inferior a tasas obtenidas mediante FIV con semen colectado de machos con desviación de conducto deferente (Pacompia, 2017; Arque, 2017) que tuvieron tasas de 60.7% y 49.41%(control) con concentraciones espermáticas de 2×10^6 espermatozoides/mL aproximadamente, la diferencia con estos últimos se debe a que los espermatozoides provenientes de éste método de colección brinda espermatozoides con mayor concentración y vitalidad libre de filancia e impurezas en comparación de la colecta por vagina artificial aparte de que se ha utilizado líquido folicular como medio, el cual produce ovocitos con una mejor maduración para la fecundación *in vitro*.

Estos datos fueron similares con los registrados por Málaga (2015) quien tuvo tasas de 38.64% frente a 35.92% con una misma concentración de 0.5 millones de



espermatozoides/mL, mientras que con concentraciones de 1 millón de espermatozoides/mL fue superior con 23.58% (25/106) frente a 11.54% y con concentraciones de 1.5 fue ligeramente inferior con una tasa de 13.64% (15/110) frente a 16.67 % este último bajo una concentración de 1.4 millones de espermatozoides/mL, esta variabilidad puede deberse al error de la cámara de Neubauer en la determinación de la concentración que escapa al experimento, mientras que los resultados para las tasas con 24 horas de FIV la mayor tasa fue de 15.25% (18/118) seguido de 13.22% (16/121) y 12.40% (16/129) con concentraciones de 0.5, 1 y 1.5 millones de espermatozoides, respectivamente, estos datos fueron casi el doble de inferior frente a los datos registrados por Pérez *et al* (2017), el cual fue de 27.5% quien también utilizó un tiempo de 24 horas FIV con una concentración aproximada de 4 millones de espermatozoides/mL, a pesar de que esta concentración es mucho mayor que las concentraciones de este estudio, la razón de dicha diferencia se encuentra en la fuente de los espermatozoides, debido a que espermatozoides obtenidos de conducto deferente son más viables que los espermatozoides obtenidos de vagina artificial, mientras que tasas de fecundación en llamas registradas por Conde *et al.* (2008) y Trasorras *et al.* (2014) quienes también utilizaron un tiempo FIV de 24 horas, fueron también superiores con tasas de 42.2 % y 36% con concentraciones de 4 millones de espermatozoides/mL, respectivamente, esto se debe a que ambos autores utilizaron gametos provenientes de animales vivos, el cual poseen mayor calidad en los parámetros de evaluación correspondiente.

Para los resultados de semen congelado la mayor tasa de clivaje a las 18 horas fue de 14.16% (16/113) seguido de 9.01% (10/111) y 6.96% (8/115) con concentraciones de 2, 4 y 6 millones de espermatozoides/mL mientras que para 24 horas fueron de 10.34%(12/116), 8.62%(10/116) y 7.26%(9/124), todos estos datos son bastante bajos en comparación con la tasas de 27.1% de Gamarra *et al.*, (2008), 35.17% y 36.82% de

Mamani, (2015), esto debido a que Gamarra *et al.*, (2008) tuvo mejores motilidades en la congelación mediante pellets, mientras que Mamani, (2015) utilizó el método Washing y Swim-up para la selección de espermatozoides de alpaca. La razón de estas tasas bajas se debe a que el semen de alpaca al someterse a congelación este se va reduciendo la motilidad y al aplicarle la técnica del Percoll reduce aún más su motilidad debido a la toxicidad del Percoll (Avery y Greve, 1995).

Los resultados obtenidos en las tasas de fecundación fueron sometidos al estadístico de ji cuadrado, demostrando que existe diferencia estadística ($p \leq 0.05$). en dichas tasas obtenidas con tales concentraciones espermáticas de semen fresco y congelado, así como en ambos tiempos de FIV.

4.2. TASA DE POLIESPERMIA DE OVOCITOS FERTILIZADOS *IN VITRO* CON SEMEN FRESCO Y CONGELADO EN DOS TIEMPOS Y CON DIFERENTES CONCENTRACIONES.

Tabla 3. Tasa de poliespermia de ovocitos fertilizados *in vitro* con semen

Estado de Semen	Tiempo FIV	Concentración ($\times 10^6$ espermatozoides/mL)	Cigotos con Poliespermia	Cigotos Totales	Tasa de Poliespermia
FRESCO	18	0.5	40	136	29.41%
		1	56	130	43.08%
		1.5	66	119	55.46%
	24	0.5	79	115	68.70%
		1	87	115	75.65%
		1.5	97	116	83.62%
CONGELADO	18	2	87	115	75.65%
		4	97	113	85.84%
		6	100	112	89.29%
	24	2	103	121	85.12%
		4	101	121	83.47%
		6	111	122	90.98%

fresco y congelado con 2 tiempos y con diferentes concentraciones

($p \leq 0.05$)

En la tabla 3 se observan los resultados de tasas de poliespermia de ovocitos fertilizados de la alpaca con semen fresco a distintos tiempos y diferentes concentraciones espermáticas, donde las mayores tasas de ovocitos que tuvieron poliespermia con semen



fresco fue de 55.46% y 83.62% a 18 y 24 horas con 1.5 millones de espermatozoides/mL respectivamente.

Esto debido a que el semen fresco contiene mayor motilidad progresiva y puede fertilizar mayor cantidad de ovocitos en cortos tiempos, mientras que, si el tiempo de fecundación se extiende, los casos de poliespermia van en aumento (Lorenzo, 1992; Bravo *et al.*, 1996), mientras que las tasas con menos poliespermia con semen fresco y congelado son de 29.41% y 75.65% respectivamente en un tiempo FIV de 18 horas y son menores debido a que la concentración utilizada fue de 0.5×10^6 espermatozoides/mL ya que con esta concentración se lograron tasas de clivaje mayores y menos casos de poliespermia (Málaga, 2015). Estas tasas bajas resultaron ser altas en comparación con otras especies como el vacuno, que dentro del proceso de FIV registra una tasa de 10% de poliespermia aproximadamente (Iwasaki *et al.*, 1989; Iwasaki y Nakahara, 1990; Kawarsky *et al.*, 1996).

Los resultados en las tasas de poliespermia con semen fresco en tiempo FIV de 18 horas fueron de 29.41% (40/136), 43.08% (56/130) y 55.46% (66/119) y para 24 horas FIV fue de 68.70% (79/115), 75.65% (87/115), 83.62% (97/116), dichas tasas fueron más elevadas en comparación con los datos de porcinos donde se tienen tasas de entre 38.8%, 32.9%, 27.2%, 20.8% y 16.4% registrados por Hao *et al.* (2006) usando una concentración de 2 millones de espermatozoides/mL con 8 horas FIV, esta diferencia puede deberse al efecto de la osteoponin sobre la reducción en las tasas de poliespermia mediante la activación de los gránulos corticales responsables de evitar dicho fenómeno, en otros estudios Benavides, (2005) registró tasas de 32.4% como control y 10% usando 20 millones de espermatozoides/mL y utilizando tetradecanoylphorbol para reducir la poliespermia mientras que en alpacas no se tiene datos de tasas de poliespermia y menos algún método para reducirla.



Los resultados de tasas de poliespermia para semen congelado fueron de 75.65% (87/115), 85.84% (97/113) y 89.29% (100/112) a 18 horas de FIV usando 2, 4 y 6 millones de espermatozoides/mL y 85.12% (103/121), 83.47% (101/121) y 90.98% (11/122) a 24 horas FIV usando 2, 4, 6 millones de espermatozoides/mL respectivamente, todos estos datos fueron mucho mayores que en comparación con especies con el porcino; especie el cual tiene muchos problemas con la poliespermia; por ejemplo Martínez, (2002) en sus estudios utilizando distintas dosis de espermatozoides congelados (10, 50, 250 y 500×10^3 /mL de espermatozoides de epidídimo) tuvo tasas de 44.19%, 57.50%, 80.7% y 91.6% respectivamente, donde las dos últimas concentraciones si llegan a coincidir con las de este estudio, estas tasas son mayores debido al uso de concentraciones mayores de espermatozoides el cual a pesar de ser semen congelado estos aumentan la incidencia de la poliespermia. Actualmente aún no se sabe el rango aproximado de poliespermia y menos aún métodos para reducir dichas tasas de poliespermia en la fecundación *in vitro* de ovocitos de alpacas.

Por último, en comparación con especies más cercanas a la fisiología reproductiva de la alpaca como el camello, estas tasas son abismalmente mayores por ejemplo Wani, (2008) registran 3% y 2% de poliespermia en FIV utilizando un millón de espermatozoides/mL a 15 horas FIV y Fathi *et al* (2014) registran tasa de poliespermia de entre 2% a 7% utilizando 2 millones de espermatozoides/mL en 18 horas de FIV con distintos dilutores. Esto podría deberse a que los gametos de camello responden mejor al procedimiento FIV que la alpaca, y otra razón podría ser el factor climático ya que estos experimentos hechos en camellos fueron llevados en Dubái, Emiratos Árabes Unidos donde el clima es de característica subtropical y a nivel del mar, el cual difiere al clima de puna seca a 4200 metros de altura donde fue realizado este trabajo de investigación.



Los resultados obtenidos en las tasas de poliespermia fueron sometidos al estadístico de ji cuadrado, demostrando que existe diferencia estadística ($p \leq 0.05$). entre las tasas obtenidas con tales concentraciones espermáticas de semen fresco y congelado, así como en ambos tiempos de FIV.



V. CONCLUSIONES

Existen diferencias en las tasas de fecundación *in vitro* utilizando distintas concentraciones de espermatozoides congelados y frescos en ambos tiempos de fecundación, en donde dichas tasas van en aumento utilizando menores concentraciones de espermatozoides y disminuyen al utilizar concentraciones mayores, notándose una relación inversa entre las concentraciones espermáticas y las tasas de fertilización así también con los tiempos de fecundación.

Existen diferencias en las tasas de poliespermia utilizando distintas concentraciones de espermatozoides congelados y frescos en ambos tiempos de fecundación, en donde dichas tasas van disminuyendo a concentraciones espermáticas menores, mientras que el incremento se produce con concentraciones espermáticas mayores. Notándose una relación directa entre las concentraciones y las tasas de poliespermia, así como con ambos tiempos de fecundación.



VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda que se evalúe la motilidad y la concentración simultáneamente como una rutina parte del protocolo de la muestra del semen después de la selección y capacitación de los espermatozoides utilizados en FIV.

Realizar estudios aplicando técnicas de epifluorescencia en el proceso de fecundación *in vitro* de ovocitos de alpacas para corregir y/o establecer un protocolo de fecundación *in vitro*, en donde las tasas de poliespermia sean lo bastante bajas para asegurar altas tasas de fecundación.

Ensayar otros métodos de selección de espermatozoides para el protocolo de fecundación *in vitro*, utilizando semen congelado, debido a que el Percoll, causó disminución en la concentración y la motilidad de las muestras congeladas.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arriaga, I., Huanca, W., Terreros, M., Becerra, J., García, P., y Ampuero, A. (2014). Efecto de Temperatura y Tiempo de Almacenamiento de Ovarios de Alpacas sobre la Tasa de Maduración y División *in vitro* de Ovocito. *RevinvVet Perú*, 25(4), 477-486.
- Arque, D.B. (2017). Influencia del fluido folicular y gonadotropinas en la maduración y fecundación de ovocitos de alpacas huacaya. Universidad Nacional del Altiplano. Puno.
- Avery, B. y Greve, T. (1995). Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for *in vitro* insemination. *Theriogenology* 44, 871–878.
- Ayuque, A. y Justiniano, E.C. (2013). Evaluación de diferentes tiempos para la maduración nuclear de ovocitos de llama (lama glama) en el desarrollo de embriones producidos por fecundación *in vitro*, Universidad Nacional de Huancavelica, Huancavelica.
- Bavister, B.D. y Yanagimachi (1977). The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod.* 16(2):228–37.
- Benavides, G. (2005), Efecto del forbol 12-miriatato 13-acetato en la reducción de polispermia en los ovocitos porcinos fertilizados *in vitro*, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Berland, M.A., Von Baer A., Ruiz, J., Parraguez, V.H., Morales, P., Adams, G.P. y Ratto, M.H. (2011). *In vitro* fertilization and development of cumulus oocytes



- complexes collected by ultrasound-guided follicle aspiration in super stimulated llamas. *Theriogenology*. 75:1482-1488
- Bustinza, V. (2001). *La alpaca conocimiento del gran potencial andino*. 1ª ed. Puno: Oficina de Recursos del Aprendizaje – Sección Publicaciones – UNA – Puno.
- Bravo, W., Moscoso, J., y Ordoñez, C. (1996); Transport of spermatozoa and ova in female alpaca. *Anim. Reprod. Science*. 43: 173 – 179
- Conde, P., Herrera, C., Chaves, M.G., Giuliano, S.M., Director, A., Trasorras, V.L., Pinto, M., Carchi, M.I., Stivale, D., Rutter, B., Agüero, A., Miragaya, M.H. y Pasqualini R.S. (2006). In vitro production of llama embryos by IVF or ICSI. *Reproduction, Fertility and Development* 19 (1) pages 237-238.
- Conde, P.A, Herrera C., Trasorras V.L., Giuliano S., Director, A., Miragaya M.H., Chaves, M.G., Carchi M.H., Stivale, D., Quintans, C., Agüero, C.A., Rutter B. y Pasqualini, S. (2008). *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Animal Reproduction Science*. 109, 298 - 308.
- Cox, J., Hormazábal, J. y Santa María, A. (1993). Effect of the cumulus on *in vitro* fertilization of bovine matured oocytes. *Theriogenology*. Vol. 40, pp. 1259-1267.
- Coy, P., Romar, R., Payton, R.R., McCann, L., Saxton, A.M. y Edwards, J.L. (2005). Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the s-enantiomer of roscovitine: effects on maturation, fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Reproduction* 129 19-26.



- Coy, P., Martinez, E., Ruiz, S., Vazquez, J.M., Roca, J. y Matás, C. (1993). Sperm concentration Influences fertilization and male pronuclear formation *In vitro* in pigs. *Theriogenology* 40 539 - 546.
- Del Campo M.R., Donoso, M.X. y Del Campo, C.H. (1992). *In vitro* maturation of Llama (Lama glama) oocytes. *Proc 12th Int Cong Anim Reprod.* vol 1, p 324.
- Del Campo, M.R. (1993). *Fecundación in vitro* (Vol. 1). Argentina: Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC).
- Del Campo, M.R., Del Campo C.H., Donosos, M., Berland, M. y 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.R., Del Campo C.H., Adams, G.P. and Mapletoft, R.J. (1995). The application of new reproductiva technologies to South American Cameljds. *Theriogenology* 43: 21-30.
- Ducibella, T. y Buetow, J. (1994). Competence to undergo normal, fertilization-induced cortical activation develops after metaphase I of meiosis in mouse oocytes. *Developmental biology.* 165 95-104.
- Fathi, M., Seida, A.A., Sobhy, R.R., Darwish, G.M., Badr, M.R., y Moawad, A.R. (2014). Caffeine supplementation during IVM improves frequencies of nuclear maturation and preimplantation development of dromedary camel oocytes following IVF. *Theriogenology.* 81, 1286–1292.



- Fukui, Y., Imai, K., Noel, F., Alonso, F. y Ono, H. (1989). Follicle culture enhances fertilizability and clivage of bovine oocytes mutured in vitro. *Journal of Animal Science*, 64; 935-941.
- Gamarra, G., Huamán, E., León, S., Carpio, M., Alvarado, E. y Vivanco, W. (2008). Primeros embriones *in vitro* de alpaca obtenidos por Maduración (MIV), Fecundación (FIV) y cultivo *in vitro* provenientes de ovarios del camal. XXXI Reunión Científica Anual de la Asociación peruana de Producción Animal.
- García, A., Castejón, F. y De la Cruz, L. (1995). *Fisiología Veterinaria*. 1ª ed. España: McGraw –Hill Interamericana editores.
- Gigli, I., Russo, A., Agüero, A. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *InVet*. 8(1):183-204.
- Gómez, C., Ratto, M.H., Berland, M., Wolter, M. y Adams, G.P. (2002). Superstimulatory response and oocyte collection in alpacas. *Theriogenology* 57:584 (abstract).
- Gordon I y LU H. (1990). Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology*. 33: p77-87.
- Guraya, S.S. (1982). Recent progress in the structure, origin, composition, and function of cortical granules in animal egg. *International review of cytology*. 78 257-360.
- Hafez E.S.E, Hafez B. (2000). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana editores.



- Hao, Y., Mathialagan, N., Walter, E., Mao, J., Lai, L., Becker, D., Li, W., Critser, J. y Prather R.S. (2006). Osteopontin reduces polyspermic pig embryos. *Biology of Reproduction*. 75 726-733
- Hawley, T. y Robert, C. (2004). *Flow Cytometry Protocols (Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), V. 263.)*. Totowa, NJ: Humana Press. ISBN 1-58829-235-5.
- Herradón, P.G., Quintela, L.A., Becerra, J.J., Ruibal, S. y Fernández, M. (2007). *In vitro* fertilization: An alternative for genetic improvement in bovines. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* vol. 15.
- Hoodboy, T. y Talbot, P. (1994). Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. *Mol Reprod Dev*. 39: 439- 448.
- Holm, P., Booth, P.J., Schmidt, M.H., Greve, T., Callesen, H. (1999). High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*. 52(4):683–700.
- Huanca, W., Cordero, A., Huanca, T. y Adams G. (2007). Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos: Avances y perspectivas. *Archivo Latinoamericano de Producción Animal*. 15(Supl 1).
- Huanca, W., Cárdenas, O., Huanca, T. y Cordero, A. (2009). Respuesta Ovárica a la Estimulación Hormonal en Llamas Prepúberes. *Memorias de la XXV Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal*. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Chiclayo Perú. p. 542-550.
- Huanca, W., Condori, R., Chileno, M., Garcia, P., Cainzo, J., y Becerra, J. (2014). Evaluación de cuatro tiempos de cultivo sobre la tasa de maduración y división



- pos fecundación *in vitro* de ovocitos de alpaca. Revista de Investigaciones Veterinarias de Perú, 25(4), 468-476.
- Hunter R.H (1991). Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. Molecular reproduction and development. 29 385-391.
- Hunter, R.H. (1973). Polyspermic fertilization in pigs after tubal deposition of excessive numbers of spermatozoa. The Journal of experimental zoology 183 57-63.
- Hunter, R.H. (1993). Sperm:egg ratios and putative molecular signals to modulate gamete Interactions in polytocous mammals. Molecular reproduction and development 35 324- 327.
- Illera, M. (1994). Reproducción de los animales domésticos. 10 Edición. España: AEDOS. 175p.
- INEI. (2016). Instituto Nacional de Estadística e Informática. Resultados. Definitivos. IV Censo Nacional Agropecuario. Ministerio de Agricultura. Lima-Perú.
- INVITROGEN. (2005). Guidelines for use – Hoechst Stains. Molecular Probes™ invitrogen detection technologies. MP 21486, Pag 03.
- Iwasaki S., Shioya Y., Masuda, H., Hanada, A. y Nakahara, T. (1989). Incidence of chromosomal anomalies meatly bovine embryos derived from *in vitro* fertilization. Gamete research 22. 83- 91
- Iwasaki, S. y Nakahara, T. (1990) Incidence of embryos with chromosomal anormalies in the inner cell mass among bovine blastocysts fertilized *in vitro*. Theriogenology 34 683-690



- Kawarsky, S.J, Basrur, P.K., Stubbings, R.B., Hansen, P.J. y King WA (1996) Chromosomal abnormalities in bovine embryos and their influence on development, *Biology of reproduction*. 54 53-59.
- Kjaer, I., Keeling, J.W, Smith, N.M., y Hansen B.F. (1997). Pattern of malformations in the axial skeleton in human triploid fetuses. *American Journal of Medical Genetics* 72 216-221.
- Lopera, R. (2009). Estudio de factores que influyen en la fecundación *in vitro* heteróloga entre espermatozoides de caprino y oocitos de bovino madurados *in vitro*. Tesis de master. Master Interuniversitaria en mejora genética animal y biotecnología de la reproducción. Universidad Politécnica de Valencia.
- Lorenzo, P. (1992). Maduración *in vitro* de oocitos de ganado vacuno. Universidad Complutense 1145 de Madrid.
- Machicado, R., Delgado, P., y Flores M. (2009). Descripción del proceso de fecundación *in vitro* de ovocitos de llama (lama glama) obtenidos por súper estimulación ovárica con eCG y fertilizados con semen tratado con proteasa. V Congreso Mundial sobre Camélidos. Riobamba, Ecuador.
- Málaga R.E, (2015). Adaptación de un protocolo de fecundación *in vitro* para alpacas (vicugna pacos) y su evaluación a 4200 msnm en el departamento de puno, Universidad Católica de Santa María, Arequipa,
- Mamani, G. (2015), Métodos de selección espermática y tasa de fecundación *in vitro* en ovocitos de alpaca. Tesis de Maestría, Maestría en Producción animal. Universidad Nacional Agraria La Molina.



- Martinez, B. (2002). Estudio de la fecundación “*in vitro*” en porcino: reducción de la poliespermia y optimización de la producción “*in vitro*” de embriones. Universidad Complutense de Madrid. España.
- Martinez, E., Ramos, M., y Ruiz, J (2015). Evaluar la capacidad fecundante de espermatozoides refrigerados en la producción de embriones *in vitro* en alpacas (Vicugna pacos) Huacaya, Reproducción animal, Universidad Nacional de Huancavelica., Facultad de Ciencias de Ingeniería., Escuela Académico Profesional de Zootecnia., Huancavelica,
- Mellisho, E., Rivas, V., Ruiz J. y Mamani G. (2014). Effect of Sperm Selection on the rate of *in vitro* fertilization in alpaca (Vicugna Pacos), *Reproduction, Fertility and Development*, 27(1) 217-218.
- Mendoza, J., Ayuque, A., Triviño, F., Ayuque, G., Landeo, L. y Ruiz, J. (2008). Evaluación de dos métodos de recuperación de espermatozoides epididimarios para la fecundación *in vitro* de ovocitos de alpaca. Efecto de la exposición a etilenglicol sobre el desarrollo partenogénico *in vitro* de ovocitos de alpaca. XXXI Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Lima.
- Miragaya, M., Chaves M.G., Capdevielle E.F., Ferrer, M.S., Pinto, M.R., Rutter B. y Neild, D.M. (2002). *In vitro* maturation of llama (Lama glama) oocytes obtained surgically using follicle aspiration. *Theriogenology* 57 (1), 731.
- Morton, K.M., Thomson, P.C., Bailey, K., Evans, G., y Maxwell W.M. (2008). Quality parameters for alpaca (Vicugna pacos) semen are affected by semen collection procedure. *Reprod. Dom Anim.* doi,



- Muiño R. (2008). Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: Identificación de subpoblaciones espermáticas. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. España. p10.
- Nagai, T., Niwa, K. y Iritani A. (1984). Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization *in vitro* of pig follicular oocytes. Journal of reproduction and fertility 70 271-275.
- Nolting, O., Hansen, B.F., Keeling, J.W., y Kjaer, V. (2002). Histological examinations of bone and cartilage in the axial skeleton of human triploidy fetuses. APMJS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica 11 O 186-192
- Novoa, C., Franco, E., García, W. y Pezo, D. (1999). Dosis de Gonadotropinas (eCG y hCG), superovulación y obtención de embriones en alpacas. RIVEP. Perú 10 (1):48-53.
- Pacompia, M.H., (2017). Efecto de las gonadotropinas en la maduración y fecundación de ovocitos en alpacas (Vicugna pacos). Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Puno,
- Palma, G.A. (2008). Biotecnología de la Reproducción. 2ª ed. Argentina.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Leibfried-Rutledge, M. L., Crister, E. S., Eyestone, W. H., y First, N. L. (1986). Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology, Vol. 25, pp. 591-600.



- Pérez, M., Zevallos J., y Pérez, U. (2014). Recuperación de espermatozoides de alpacas del conducto deferente durante la época reproductiva Spermova. 2014; 4(2): 139 – 144.
- Pérez, M., Zevallos, J., y Pérez, H. (2017). Comparación de sistemas de cultivo de embriones de alpacas. Rev. Investig. Altoandin., 157 – 164.
- Plackett, R.L. (1983). Karl Pearson and the Chi-Squared Test. International Statistical Review (International Statistical Institute (ISI)) 51 (1): 59-72.
- Quintano, J. (2002). Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (*Lama pacos*) colectados del conducto deferente con el uso de tres dilutores. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.
- Quispe U.S, (2018). Influencia de las hormonas folículo estimulante, luteinizante y gonadotropina coriónica equina en la maduración *in vitro* de ovocitos y clivaje de embriones de alpaca. Universidad Nacional del Altiplano - Escuela de Post-grado, Puno.
- Ratto, M, Wolter, M., Gómez C., Berland, M., y Adams, G. (1999). *In vitro* maturation of llama oocytes. Libro de resúmenes. II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco-Perú.
- Ratto, M, Berlan, M., Huanca W., Singh J., y Adams, G. (2005). *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes. Theriogenology 63: 2445-2457.
- Ratto, M., Gómez, C., Berland, M., y Adams G. (2007). Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. Animal Reproduction Science 97: 246-256.



- Risopatrón J. (1991). Efecto de la temperatura de mantención de los ovarios sobre la maduración, fecundación y desarrollo de ovocitos de bovino. Universidad Austral de Chile.
- Romar, R. (1999). Fecundación *in vitro* de ovocitos porcinos madurados bajo diferentes condiciones. Universidad de Murcia. España. 20(2): 693-695.
- Ruiz, J., Correa, J., Ayuque, G., Landeo, L., Yaranga, M., y Zacarías A. (2007). Producción *in vitro* de embriones partenogénéticos de alpaca y llama. I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú. 20 - 22 de noviembre.
- Ruiz, J., (2015). Estado de la producción de embriones *in vitro* en camélidos sudamericanos. *Spermova*, 5(2): 264-269.
- Saavedra, M.D., (2009). Estudio de la composición de los gránulos corticales y del oolema de ovocitos porcinos y bovinos madurados y fecundados *in vitro*, Universidad de Murcia, Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, España.
- Saeki, K.M., Leibfried-Rutledge y First N.L. (1990). Are fetal calf serum and hormones necessary during *in vitro* maturation of cattle oocytes for subsequent development? *Theriogenology* 33: 316.
- Salgado, R.D., Rugeles, C.C., Avarez, J. (2005). Efecto de la heparina y de la concentración espermática sobre el porcentaje de fertilización de oocitos bovinos *in vitro*. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. Vol 18:2.



- Santa Cruz, C., Huanca, W., Condori, R., y Ampuero, A. (2014). Uso de macromoléculas sobre la tasa de maduración y desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos bovinos. *Rev. Inv. Vet. Perú* 25 (4): 487 – 493.
- SENAMHI. (2012). Dirección Regional Puno. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología. Perú.
- Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S., y Hanada, A. (1988). *In vitro* fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured *in vitro*. *Theriogenology*, Vol 30, pp. 489- 496.
- Sorensen, A. (1991). Evaluación de la aptitud reproductiva., ed. Reproducción animal, principios básicos y prácticas. 1a ed. McGraw-Hill. p 124-143.
- Trasorras, V.L. (2012). Producción de embriones *in vivo* e *in vitro* en camélidos sudamericanos. *Spermova*. 19-21.
- Trasorras, V.L., Baca Castex C., Alonso, A., Giuliano S., Santa Cruz R., Arraztoa C., Chaves, G., Rodríguez, D., Neild, D., y Miragaya, M. (2014). First llama (*Lama glama*) pregnancy obtained after *in vitro* fertilization and *in vitro* culture of gametes from live animals. *Anim Reprod Science*. 148, 83–89.
- Trasorras, V.L., y Miragaya, M.H., (2016). Factores que afectan el desarrollo de la fecundación *in vitro* en camélidos. *Spermova*, 6(2) 104-106.
- Turner R.M. (2003). Tales from the Tail: What Do We Really Know about Sperm Motility. *Journal of Andrology* 24, 790-803.
- Wang, W.H., Aheydeera, L.R., Prather R.S., y Day, B.N. (1998). Morphologic comparison of ovulated and *in vitro*-matured porcine oocytes, with particular



reference to polyspermy after *in vitro* fertilization. Molecular reproduction and development, 49 308- 316.

Wani N.A. (2008). *In vitro* embryo production in camel (*Camelus dromedarius*) from *in vitro* matured oocytes fertilized with epididymal spermatozoa stored at 4 °C. Animal Reproduction Science, United Arab Emirates, 111; 69–79

Wheeler, J. (2012) South American camelids past, present and future. Journal of Camelid Science. 5:1-24.

World Health Organization. (2010). Laboratory manual for the Examination and processing of human semen, Fifth edition. Geneve Switzerland.

Zhang, L., Jiang, S., Wozniak, P., Yang, X. y Godke, R. (1995). Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and early embryo development *in vitro*. Mol. Rep. Dev. Vol. 40, pp. 338 - 344.

ANEXOS

Anexo A. Composición de Medios.

Tabla 4. Medio de Lavado (D-PBS Stock), para 500 μ L

Agua ultra-pura	500 mL.
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.0660 g.
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.0600 g.
NaCl	4.0000 g.
KCl	0.1000 g.
Na ₂ HPO ₄	0.5750 g.
KH ₂ PO ₄	0.1000 g.
Glucosa	0.5000 g.
Piruvato de Sodio	0.0180 g.
BSA	1.000 g.
Gentamicina	5 mL.

Tabla 5. Medio de Maduración TCM-199, para 10 mL

COMPOSICION	VOLUMEN
Solución L-Glutamina	20 μ L
Piruvato de Sodio	60 μ L
SFB	1000 μ L
Gentamicina (Filtración)	50 μ L
Estradiol	10 μ L
LH	10 μ L
FSH	10 μ L
EFG	10 μ L

Tabla 6. Medio de Fecundación Fertil-TALP de trabajo para 10 mL

Solución de Fertil-TALP STOCK	Volumen
MgCl ₂ +2H ₂ O	234 μ L
CaCl ₂ +2H ₂ O	204 μ L
Lactato de Sodio (Composición)	18.7 μ L
Piruvato de Sodio	25 μ L
BSA	0.06 g
Heparina	10 μ L
Gentamicina	50 μ L



Tabla 7. Medio de Capacitación Sperm-TALP de trabajo para 10 mL

Solución de TALP-SPERM-STOCK	Volumen
MgCl ₂ +2H ₂ O	234 µL
CaCl ₂ +2H ₂ O	104.7 µL
Sodium LD-lactate (Composición)	40 µL
Piruvato de Sodio	100 µL
BSA	0.03 g
Gentamicina	50 µL

Tabla 8. Medio de Cultivo SOF de trabajo para 10 mL

Solución SOF-STOCK	Volumen
MgCl ₂ +2H ₂ O	136.8 µL
CaCl ₂ +2H ₂ O	200 µL
Lactato de sodio DL (Composición)	10 µL
Piruvato de Sodio	40 µL
Solución L-Glutamine	27 µL
BSA	0.06 g
Amino ácidos esenciales	200 µL
Amino ácidos no esenciales	100 µL
EGF-IGF	10 µL
Ácido cítrico	10 µL
Myo- inositol	100 µL
SFB2%	200 µL
Gentamicina	50 µL

Tabla 9. Resultados obtenidos del clivaje de ovocitos fecundados *in vitro* con espermatozoides provenientes de semen fresco bajo 2 tiempos y 3 concentraciones espermáticas.

Tiempo FIV (horas)	Concentración espermática (millones/mL)	Motilidad Espermática (%)	# de Ovocitos Fecundados	Calidad de Ovocitos Maduros	Divisiones de blastómeros (Clivaje)			No Fertilizados
					2	4	8	
18	0.5	40	20	A/B	4	3	6	7
		40	22	A/B	1	2	3	16
		40	20	A/B	4	3	1	12
		40	20	A/B	1	1	1	17
		50	21	A/B	3	2	2	14
		40	23	A/B	6	4	3	10
	1	40	22	A/B	2	0	2	18
		40	20	A/B	2	1	0	17
		50	21	A/B	2	0	0	19
		50	20	A/B	2	1	0	17
		40	23	A/B	0	4	3	16
		40	24	A/B	0	1	3	20
	1.5	50	20	A/B	1	0	0	19
		50	20	A/B	0	1	0	19
		25	23	A/B	1	1	0	21
		50	23	A/B	2	4	0	17
		50	24	A/B	1	1	0	22
		50	22	A/B	3	0	0	19
24	0.5	50	22	A/B	3	0	0	19
		50	25	A/B	1	3	0	21
		50	22	A/B	3	0	0	19
		50	23	A/B	1	0	4	18
		50	25	A/B	1	0	0	24
		50	25	A/B	1	1	1	22
	1	50	23	A/B	3	3	0	17
		50	25	A/B	1	0	0	24
		50	28	A/B	1	2	0	25
		50	21	A/B	2	2	0	17
		50	26	A/B	2	1	0	23
		50	28	A/B	1	2	0	25
1.5	50	26	A/B	2	1	0	23	
	50	28	A/B	1	2	0	25	
	50	26	A/B	2	1	0	23	

Tabla 10. Resultados de clivaje de ovocitos fecundados *in vitro* con espermatozoides provenientes de semen congelado bajo 2 tiempos y 3 concentraciones espermáticas.

Tiempo FIV (horas)	Concentración espermática (millones/mL)	Motilidad Espermática (%)	# de Ovocitos Fecundados	Calidad de Ovocitos Maduros	Divisiones de blastómeros (Clivaje)			No Fertilizados
					2	4	8	
18	2	20	21	A/B	1	0	0	20
		25	22	A/B	2	1	1	18
		25	23	A/B	0	2	2	19
		30	24	A/B	1	1	1	21
		30	23	A/B	2	0	2	19
		20	21	A/B	0	1	0	20
	4	25	22	A/B	2	0	0	20
		30	24	A/B	2	0	1	21
		25	22	A/B	2	0	0	20
		25	22	A/B	2	0	0	20
		25	20	A/B	3	0	0	17
		30	24	A/B	2	0	0	22
	6	30	25	A/B	1	0	0	24
		25	23	A/B	1	0	0	22
		30	23	A/B	1	0	0	22
		30	26	A/B	3	0	1	22
		30	21	A/B	1	1	0	19
		30	22	A/B	0	0	1	21
24	4	30	25	A/B	3	0	1	21
		30	22	A/B	0	0	1	21
		30	24	A/B	1	0	1	22
		30	24	A/B	1	2	0	21
		30	22	A/B	0	0	1	21
		30	23	A/B	1	0	1	21
	6	30	23	A/B	1	0	1	21
		30	24	A/B	1	1	0	22
		30	25	A/B	1	2	0	22
		30	25	A/B	1	1	0	23
		30	25	A/B	1	0	0	24
		30	25	A/B	1	0	0	24

Tabla 11. Resultados de cigotos con poliespermia fecundados *in vitro* con espermatozoides provenientes de semen fresco, bajo 2 tiempos y 3 concentraciones espermáticas.

Tiempo FIV (horas)	Concentración espermática (millones/mL)	Motilidad Espermática (%)	# de Ovocitos Fecundados	Calidad de Ovocitos	>2 cabezas espermáticas	>2 Pronúcleos
18	0.5	45	26	A/B	4	3
		45	26	A/B	5	2
		45	23	A/B	6	4
		45	38	A/B	5	3
		45	23	A/B	3	5
	1	45	24	A/B	9	2
		45	21	A/B	7	3
		45	35	A/B	7	4
		45	25	A/B	10	3
		45	25	A/B	8	3
	1.5	45	25	A/B	10	8
		45	20	A/B	10	1
		45	24	A/B	7	1
		45	25	A/B	16	2
		45	25	A/B	7	4
24	0.5	50	23	A/B	13	2
		50	23	A/B	12	4
		50	23	A/B	11	6
		50	23	A/B	13	2
		50	23	A/B	14	2
	1	50	23	A/B	14	3
		50	23	A/B	16	2
		50	23	A/B	16	1
		50	23	A/B	12	6
		50	23	A/B	14	3
	1.5	50	23	A/B	15	3
		50	23	A/B	18	2
		50	23	A/B	22	1
		50	23	A/B	14	4
		50	24	A/B	13	5

Tabla 12. Resultados de cigotos con poliespermia fecundados con espermatozoides provenientes de semen congelado, bajo 2 tiempos y 3 concentraciones espermáticas.

Tiempo FIV (horas)	Concentración espermática (millones/mL)	Motilidad Espermática (%)	# de Ovocitos Fecundados	Calidad de Ovocitos	>2 cabezas espermáticas	>2 Pronúcleos
18	2	30	23	A/B	16	1
		30	23	A/B	15	4
		30	23	A/B	14	3
		30	23	A/B	14	3
		30	23	A/B	15	2
	4	30	21	A/B	19	0
		30	23	A/B	20	0
		30	23	A/B	19	1
		30	23	A/B	19	0
		30	23	A/B	18	1
	6	30	20	A/B	19	1
		30	23	A/B	18	2
		30	23	A/B	18	2
		30	23	A/B	18	1
		30	23	A/B	20	1
24	2	30	23	A/B	20	1
		30	25	A/B	19	2
		25	24	A/B	18	2
		30	25	A/B	19	2
		25	24	A/B	18	2
	4	20	24	A/B	14	3
		30	25	A/B	21	2
		25	24	A/B	21	1
		25	24	A/B	22	0
		20	24	A/B	16	1
	6	20	24	A/B	20	3
		30	25	A/B	21	2
		25	24	A/B	20	1
		30	25	A/B	22	1
		25	24	A/B	21	0

ANEXO B. Figuras del trabajo de investigación.



Figura 3. Lavado de ovarios colectados de animales beneficiados en camal.

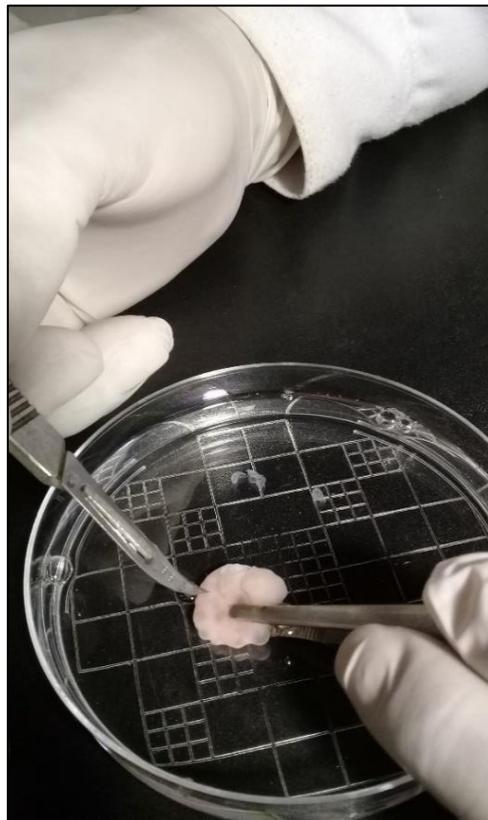


Figura 4. Seccionamiento folicular mediante método de “Slicing”.

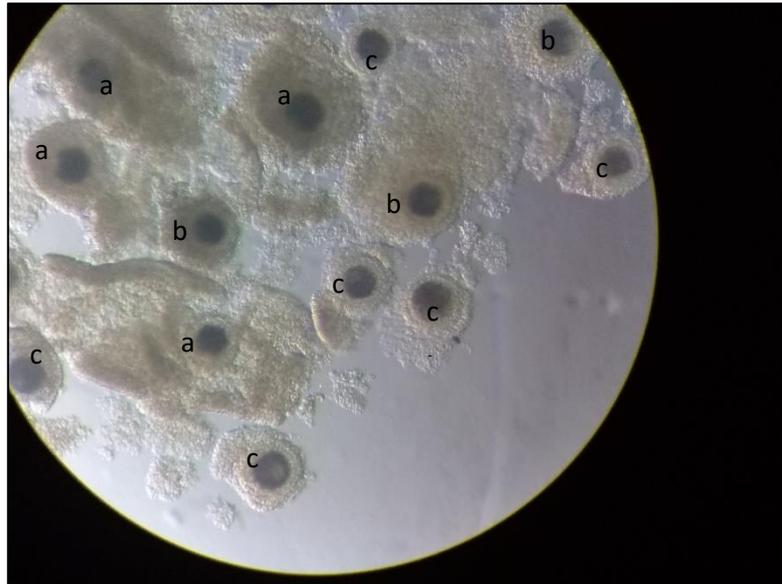


Figura 5. Clasificación de los CCOs: CCOs de categoría A (a); CCO de categoría B (b) y CCO de categoría C (c).

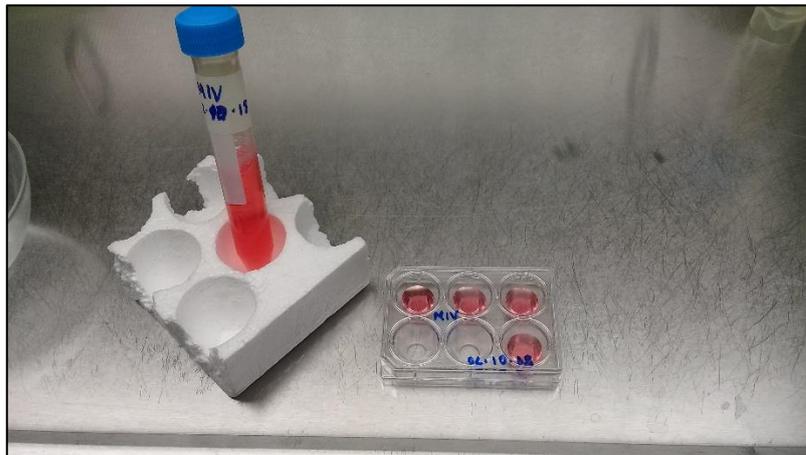


Figura 6. Plaqueo y rotulado del medio de Maduración TCM-199.



Figura 7. Colocación del medio TCM-199 junto los CCOs en la incubadora.

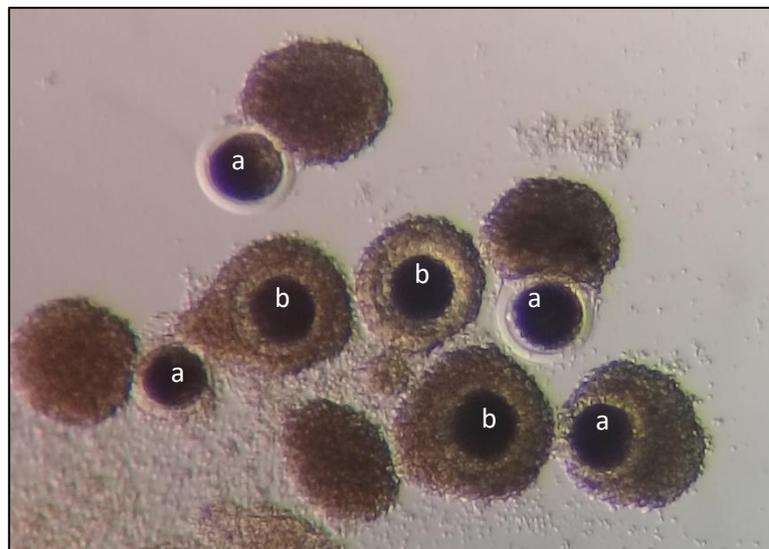


Figura 8. Evaluación de la maduración de ovocitos en medio TCM (36 horas). Ovocitos maduros con grado de compactación 3 (a), Ovocitos con grado de compactación 2 (b).



Figura 9. Colecta de semen mediante Vagina Artificial colocada en maniquí.



Figura 10. Muestra de semen diluída en Steridyl® y colocada a baño maría.

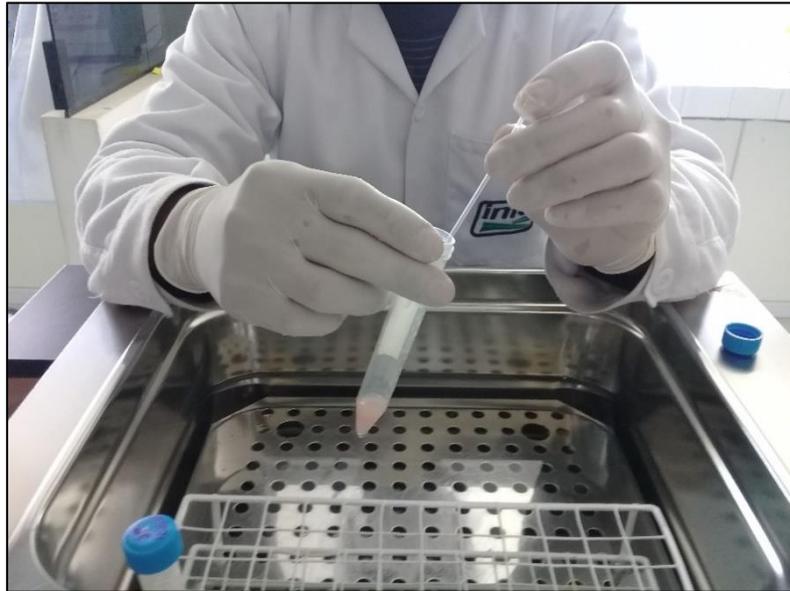


Figura 11. Descongelación y dilución del semen congelado en medio Sperm-TALP.

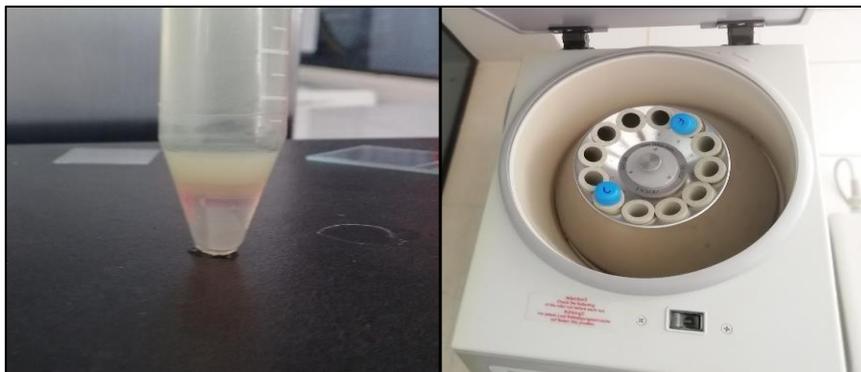


Figura 12. Tubo Falcon con la columna de Percoll y colocación en la centrifuga.

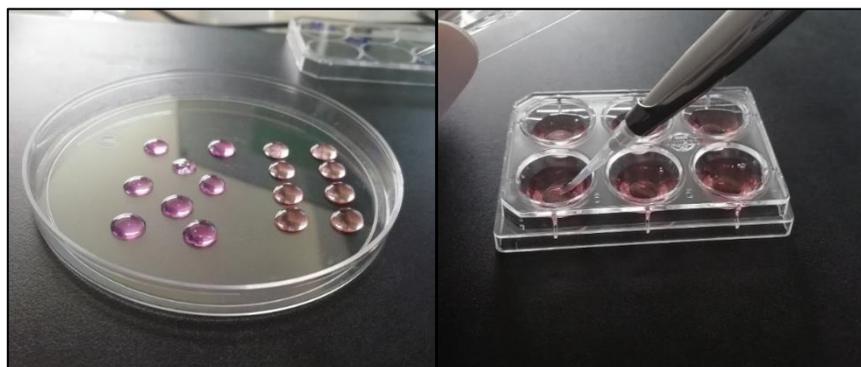


Figura 13. Placa Petri con gotas de medio Fertil TALP para lavado y Paca de 6 pocillos para FIV.

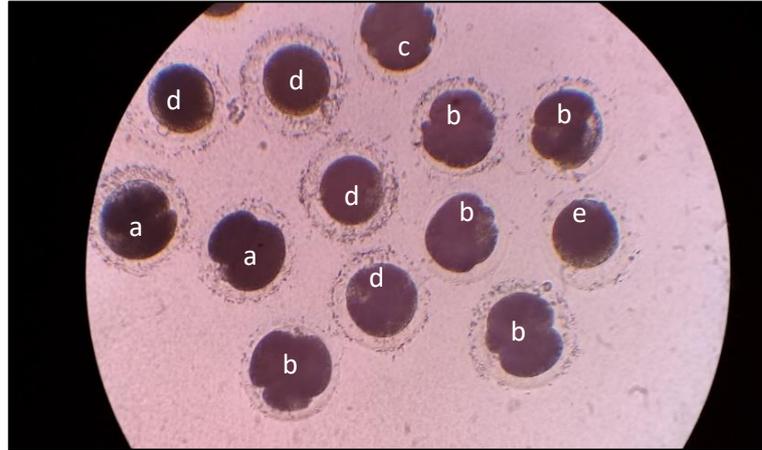


Figura 14. Clivaje de cigotos: (a) Cigoto con 2 divisiones (b) Cigoto con 4 divisiones, (c) Cigoto con 8 divisiones, (d) Ovocito no fertilizado, (e) Ovocito degenerado.

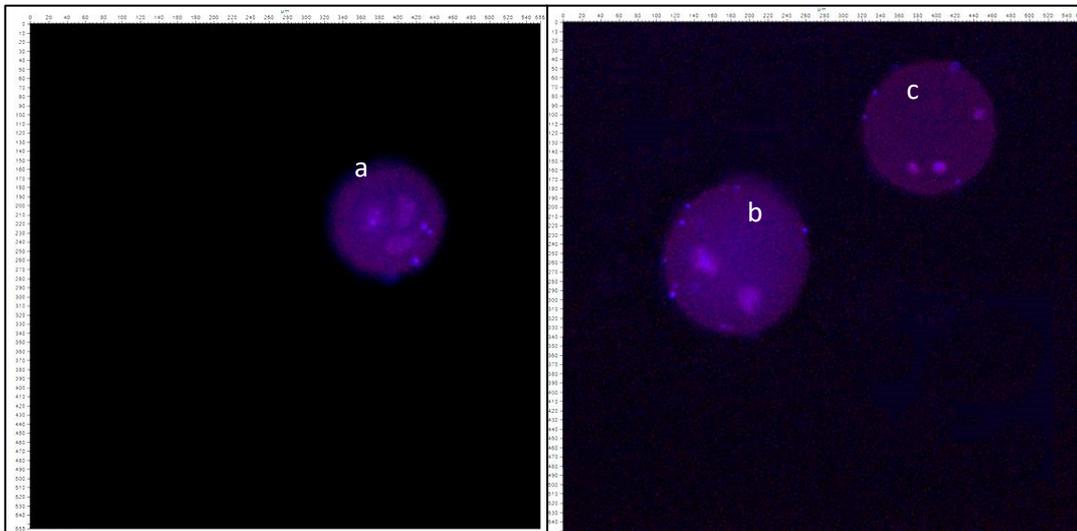


Figura 15. Tinción fluorescente de cigotos con Hoechst 33345. Lado izquierdo: ovocito poliespérmico con 3 pronúcleos(a), Lado derecho: ovocitos con 2 pronúcleos (b) y ovocito con 2 descondensaciones espermáticas(c).