

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE AGRONOMIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



TESIS

EVALUACIÓN *in vitro* DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DE ALPACAS BAJO UN SISTEMA CONTINUO Y CONVENCIONAL

PRESENTADO POR:

Bach. CENDY LUTZ CCASA CCAHUANA

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
MEDICO VETERINARIO**

ASESORES:

M.V.Z. PhD. PEDRO WALTER BRAVO MATHEUS

Mg. Sc. GUIULFO DURIEL MAMANI MANGO

Financiado por: Programa “YACHAYNINCHIS
WIÑARINANPAQ” - UNSAAC

Cusco-Perú

2023

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, **Asesor** del trabajo de investigación/tesis titulada: Evaluación in-vitro del desarrollo embrionario de alpacas bajo un sistema continuo y convencional

presentado por: Candy Lutz Ccasa Ccahuana con DNI Nro.: 47998400

presentado por: con DNI Nro.:

para optar el título profesional/grado académico de Médico Veterinario

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 1 veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 0%.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	<input checked="" type="checkbox"/>
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	<input type="checkbox"/>
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	<input type="checkbox"/>

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto** la primera página del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco 28 de diciembre de 2023

Walter Bravo M
Firma

Post firma Pedro Walter Bravo Matheus

Nro. de DNI 23954705

ORCID del Asesor 0000-0002-4257-9394

ORCID del 2° Asesor 0000-0001-8109-7702
DNI: 41061125

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: oid: 27259: 300923777

NOMBRE DEL TRABAJO

TESIS FINAL (2).pdf

AUTOR

Cendy Ccasa

RECUENTO DE PALABRAS

19453 Words

RECUENTO DE CARACTERES

109017 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

85 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

1.6MB

FECHA DE ENTREGA

Dec 28, 2023 11:13 PM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Dec 28, 2023 11:15 PM GMT-5**● 0% de similitud general**

Esta entrega no coincidió con ningún contenido comparado.

- 0% Base de datos de publicaciones
- 0% Base de datos de trabajos entregados

● Excluir del Reporte de Similitud

- Base de datos de Internet
- Base de datos de contenido publicado de Crossref
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 20 palabras)
- Base de datos de Crossref
- Material bibliográfico
- Material citado

DEDICATORIA

*A ti mi **DIOS** por guiarme en el camino
del aprendizaje durante mi formación
profesional.*

*A mis queridos padres **José Luis Ccasa
Erazo** y **Genoveva Ccahuana Montalvo** por
su infinito amor, apoyo incondicional.*

*A mis hermanos **Flor Deliz** y **José Antoni**
por ser parte en esta etapa de mi vida
profesional.*

AGRADECIMIENTO

- A **DIOS**, por acompañarme y darme fuerza para superar las pruebas a lo largo de mi carrera profesional.
- A la **Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco** por permitir formarme en sus aulas, compartiendo experiencias, sueños y anhelos.
- Mis agradecimientos más profundos al **PROGRAMA YACHAYNINCHIS WIÑARINANPAQ** por su gran apoyo para que este trabajo de tesis culmine.
- Mis sinceros agradecimientos a mis asesores doctores **Pedro Walter BRAVO MATHEUS** y **Guiulfo Duriel MAMANI MANGO** por su paciencia, guía, por brindarme su confianza y su amistad y consejos hasta el término del trabajo de tesis.
- A todos mis docentes de la escuela profesional de **MEDICINA VETERINARIA - SICUANI**, agradecer por enriquecer nuestro conocimiento y guiarnos en el aprendizaje de las diferentes materias durante estos años de estudio.
- A Julia Huarancca Huarancca, Cristóbal Huamani Carrión, Dina Mamani Huarca, Priscila, Abreu, Luz Gabriela, Delia por su amistad, lealtad, solidaridad, sinceridad y apoyo incondicional.
- Mis agradecimientos a mi familia, compañeros, amigos por su apoyo incondicional durante el trabajo de investigación.

ÍNDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ANEXO FIGURAS	ix
ANEXO TABLAS	xi
LISTADO DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
1. Problema de investigación	3
CAPÍTULO II.....	5
Objetivos, Hipótesis y Justificación.....	5
2.1. Objetivos	5
2.1.1. Objetivo General.....	5
2.1.2. Objetivos Específicos	5
2.2. Hipótesis de investigación.....	5
2.3. Justificación.....	5
CAPÍTULO III.....	7
Marco Teórico.....	7
3.1. Antecedentes de la investigación	7
3.2. Revisión bibliográfica	11

3.2.1. Biotecnología reproductiva.....	11
3.2.2. Maduración <i>in vitro</i> de COCs	12
3.2.3. Lavado y capacitación de espermatozoides	16
3.2.4. Fertilización <i>in vitro</i> de alpacas	17
3.2.5. Desarrollo embrionario	20
3.2.6. Evaluación embrionaria bajo un sistema convencional.....	24
3.2.7. Evaluación embrionaria bajo un sistema de evaluación continua.....	25
CAPÍTULO IV	28
Materiales y Métodos.....	28
4.1. Ubicación Geográfica.....	28
4.2. Animales y Muestra	28
4.3. Materiales de estudio.....	29
4.3.1. Materiales biológicos.....	29
4.3.2. Materiales necesarios para el trabajo de campo	29
4.3.3. Materiales de laboratorio	29
4.3.4. Insumos para FIV	30
4.3.5. Equipos del laboratorio.....	30
4.4. Metodología.....	31
4.4.1. Preparación de equipos, materiales y medios de cultivo para sistema convencional y continuo.....	31
4.4.2. Obtención y traslado de ovarios y testículos	31
4.4.3. Aspiración de COCs	31
4.4.4. Lavado y clasificación de COCs.....	32
4.4.5. Maduración <i>in vitro</i> de COCs	32
4.4.6. Lavado de espermatozoides	33
4.4.7. Fecundación <i>in vitro</i>	34
4.4.8. Cultivo <i>in vitro</i> de cigotos.....	34

4.5. Evaluación del desarrollo embrionario <i>in vitro</i> por sistema convencional y por sistema continuo	34
4.6. Análisis estadístico	36
CAPÍTULO V	37
Resultados y discusión	37
5.1. Desarrollo embrionario <i>in vitro</i> a las 48 horas pos fecundación	37
5.2. Desarrollo embrionario <i>in vitro</i> a las 120 horas pos fecundación	39
5.3. Desarrollo embrionario <i>in vitro</i> de alpacas a las 168 horas pos fecundación	40
CAPÍTULO VI	43
Conclusiones	43
Recomendaciones	44
CAPÍTULO VII	45
Referencias y Anexos	45
7.1. Referencias	45
7.2. Anexos	60
7.2.1. Anexo figuras	60
7.2.2. Anexo tablas	70

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Ovocito inmaduro.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 2. Características de un ovocito maduro.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 3. Proceso de la fertilización.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 4. Cigoto y sus partes.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 5. División de blastómeros de la primera división, segunda división y tercera división.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 6. Cuarta división mórula.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 7. Componentes del blastocisto.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 8. Etapas del desarrollo embrionario.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 9. Mapa de ubicación del Laboratorio de Embriología Veterinaria. EP Medicina Veterinaria UNSAAC.....</i>	<i>28</i>

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción morfológica de Complejo Ovocito-Cumulo (COCs)	14
Tabla 2. Clasificación de la calidad Embrionaria.	27
Tabla 3. Desarrollo embrionario in vitro de alpacas a las 48 horas pos fecundación según sistemas de incubación convencional y continuo.	37
Tabla 4. Desarrollo embrionario in vitro de alpacas a las 120 horas pos fecundación según el sistema de incubación convencional y continuo.....	39
Tabla 5. Desarrollo embrionario in vitro de alpacas a las 168 horas pos fecundación según sistema de incubación convencional y continuo.....	40

ANEXO FIGURAS

<i>Figura 1. Obtención de ovarios a 37 °C</i>	60
<i>Figura 2. Aspiración de COCs</i>	60
<i>Figura 3. Traslado de ovocitos a una placa Petri para su selección y lavado de COCs.</i>	60
<i>Figura 4. Medio de lavado de ovocitos</i>	61
<i>Figura 5. Lavado y selección de COCs</i>	61
<i>Figura 6. COCs de diferentes categorías</i>	61
<i>Figura 7. Ovocito de grado I</i>	62
<i>Figura 8. Ovocito de grado II</i>	62
<i>Figura 9. Ovocito de grado III</i>	62
<i>Figura 10. Ovocito de grado IV</i>	63
<i>Figura 11. Preparación de placas de cultivo</i>	63
<i>Figura 12. Incubadora de CO₂ sistema convencional</i>	64
<i>Figura 13. Incubadora del sistema continuo</i>	64
<i>Figura 14. COC's maduros (expansión de las células del cumulus)</i>	64
<i>Figura 15. Obtención de espermatozoides epididimarios</i>	65
<i>Figura 16. Verificación de la motilidad de espermatozoides</i>	65
<i>Figura 17. Embriones a las 48 horas pos fecundación por sistema convencional</i>	66
<i>Figura 18. Embriones a las 48 horas pos fecundación por sistema continuo</i>	66
<i>Figura 19. Embriones a las 120 horas pos fecundación por sistema convencional</i>	67
<i>Figura 20. Embriones de 120 horas pos fecundación del sistema continuo</i>	67

Figura 21. *Embriones de 168 horas pos fecundación del sistema convencional 68*

Figura 22. *Embriones de 168 horas pos fecundación del sistema continuo..... 69*

ANEXO TABLAS

Anexo tabla 1. Preparación de medio para lavado de espermatozoides (SP-TALP).....70

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	: Ácido desoxirribonucleico
ARN	: Ácido ribonucleico
BSA	: Albúmina sérica bovina
CI	: Incubadora convencional
CIV	: Cultivo <i>in vitro</i>
COCs	: Complejos cúmulos-ovocitos
CO ₂	: Dióxido de carbono
CR1	: Charles Rosenkrans
CSA	: Camélidos Sudamericanos
CZB	: Medio Chatot, Ziomek, Bavister
ET	: Transferencia de embriones
FIV	: Fecundación <i>in vitro</i>
FER-TALP	: Medio de tiroides que contiene albumina, lactato y piruvato para la fertilización o medio oviductal.
FSH	: Hormona Folículo Estimulante
HDL	: Lipoproteínas de alta densidad
HEPES	: Compuesto orgánico zwitteriónico, solución tampón en bioquímica.
hCG	: Hormona gonadotropina coriónica humana
IETS	: Sociedad Internacional de Tecnología Embrionaria
ICSI	: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
INEI	: Instituto nacional de Estadística e Informática
KSOM	: Medio optimizado simple de potasio
KSOMaa	: Medio de optimización simple de potasio + aminoácidos
LH	: Hormona luteinizante

MCI	: Masa celular interna
MIV	: Maduración <i>in vitro</i>
MINAGRI	: Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego
NaCl	: Cloruro de sodio
OPU	: Aspiración Folicular por Ultrasonografía
PIV	: Producción <i>in vitro</i> de embriones
PHE	: Penicilamina, hipotaurina y epinefrina
SCNT	: Transferencia nuclear de células somáticas
SFB	: Suero fetal bovino
SOF	: Fluido oviductal sintético
SOFa	: Fluido oviductal sintético + aminoácidos
SOFm	: Fluido oviductal sintético modificado
SP-TALP	: Medio de tiroides que contiene albumina, lactato y piruvato o medio oviductal para el lavado de espermatozoides.
TCM – 199	: Medio de cultivo de tejido-199
TLS	: Time-Lapse System
TRA	: Técnicas de reproducción asistida

RESUMEN

El objetivo del estudio fue comparar el desarrollo embrionario temprano *in vitro* de alpacas a través de un sistema continuo y convencional durante 168 horas pos fecundación. Se obtuvieron 224 ovarios de alpacas beneficiadas. Los complejos cúmulo-ovocito (COCs) se aspiraron de folículos entre 3mm a 7mm. Posteriormente se seleccionaron los COCS de grado I, II y III considerando el número de capas de células del cumulus; éstos a su vez se dividieron aleatoriamente en dos grupos. Grupo 1 para sistema continuo y grupo 2 para sistema convencional; en ambos sistemas la incubación se realizó a una temperatura de 38.5 °C, y 5% de CO₂. Se utilizó un medio comercial para la fertilización *in vitro* Stroebech Media® de un solo paso, por un tiempo de 26h para la maduración de COCs. La fecundación *in vitro* fue con espermatozoides de la cola del epidídimo. Los ovocitos fecundados fueron evaluados por tres tiempos diferentes, 48h, 120h, y 168h. Los datos analizados a las 48h fueron similares 25.98% versus 27.07% para 2 a 4 células y embriones > 4 células 7.85% versus 8.86% en los sistemas continuo y convencional ($p>0.05$). En 120h de embriones con 8 células 23.21% versus 21.91% y mórulas 39.28%, versus 45.20% de sistemas continuo y convencional ($p>0.05$). Y 168h de calidad embrionaria fue 25.71% frente a 34.69% de excelentes, 18.57% frente a 20.40% buenos, 8.57% frente a 8.16% regulares, 5.7% frente a 2.04% malos por sistema continuo y convencional ($p>0.05$). Conclusión estas evidencias sugieren que la producción embrionaria *in vitro* se puede realizar en sistema continuo o sistema convencional.

Palabras claves: Cultivo celular, fertilización *in vitro*, embriones, Alpaca.

ABSTRACT

The early in-vitro embryonic development of alpacas was compared under two systems of culture: Continuous and Conventional. Two hundred and twenty-four ovaries were collected from alpacas from the Sicuani slaughterhouse and cultured at the Embryology laboratory of the School of Veterinary Medicine, Cusco San Antonio Abad University. The COCs were aspirated using a 10 mL syringe and graded into Grades I, II, and III. They were randomly assigned to continuous or conventional culture systems. Both methods used a 5% CO₂ and cultured at 38.5 °C. *In vitro* inseminated oocytes were evaluated at three times: 48, 120, and 168 hours. Data were analyzed using the Kruskal-Wallis method. Two to four cells segmented oocytes were 25.9 and 27.1% for continuous and conventional incubation, respectively. More than five cells segmented oocytes were present, 8.9 and 7.8 for continuous and conventional incubation. Eight cells and morula embryos were 21.9 and 45.2% ($P \geq 0.05$) for continuous and conventional culture systems, respectively. Embryo quality was excellent, 34.7%, good, 20.4%, 8.2% regular, and 2% poor for the conventional method. For the continuous method was 25.7, 18.6, 8.6, and 5.7%, respectively. The segmentation, morulae, and blastocyst rates were similar for the conventional and continuous systems of culture.

Keywords: Cell culture, *in vitro* fertilization, embryos, Alpaca

INTRODUCCIÓN

Existen alrededor de 7,5 millones de camélidos sudamericanos (CSA) también denominado camélidos del Nuevo Mundo en América del Sur que están agrupadas en cuatro especies: llama (*Lama glama*), alpaca (*Vicugna pacos*) que son especies domésticas, guanaco (*Lama guanicoe*), vicuña (*Vicugna vicugna*) estas dos últimas especies son silvestres, (Fowler y Bravo, 2010; Quispe et al., 2009). Se encuentran distribuidas en las cordilleras de los países como Ecuador, Bolivia, Argentina, Chile y Perú. Perú está en el primer lugar en ocupar esta posición en el cuidado y pastoreo principalmente de las alpacas (Quispe et al., 2009) con una población de 3,7 millones, que se encuentran entre Puno, Cusco, Arequipa, Junín, Huancavelica y Ayacucho donde Cusco se ubica en la segunda región en producir 546 mil alpacas (MINAGRI, 2018; Contreras et al., 2014; Ruiz, 2022) por las zonas alto andinas. Son las únicas especies en adaptarse a climas entre 3000 a 5000 m.s.n.m que otras especies domesticas (ovinos, vacunos), las extensas áreas de hierbas nativas son aprovechados por las alpacas como alimentos de calidad, pero con suelos pobres lo que limita la agricultura (Fowler y Bravo; 2010; Contreras et al., 2014). El manejo de alpacas son una actividad muy importante por su alta calidad de fibra y carne que repercute en el desarrollo de las comunidades pobres y del país en el ámbito socio económico (Contreras et al., 2014; Fowler y Bravo; 2010).

La producción *in vitro* de embriones (PIV) o la FIV es una serie de biotecnologías, que van desde la obtención de ovocitos, maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos, la fertilización *in vitro* (FIV) o la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) hasta la clonación de animales, y cultivo embrionario *in vitro* (CIV) se han desarrollado y mejorado continuamente durante las últimas décadas a través de estudios en animales y humanos (Wang y Sun, 2007; Tribulo y Tribulo, 2021; Ressaissi et al., 2021). Con equipos o sistemas de incubación que intervienen en el desarrollo y calidad del embrión producidos *in vitro* (Gou et al., 2022; Armstrong et al., 2018), actualmente se utilizan dos enfoques principales para el cultivo de embriones en el laboratorio de embriología: cultivo ininterrumpido con un equipo Time Lapse System (Biggers y Summers, 2008; Biggers, 1998; Chen et al., 2020) y, cultivo secuencial donde se utilizan incubadoras convencionales con un cambio obligatorio de ambiente al momento de evaluar el desarrollo embrionario (Summers y Biggers., 2003; Chen et al., 2020; Gardner y Lane, 2002). Ambos sistemas establecen un ambiente que favorece el desarrollo embrionario (Mahdavinezhad et al., 2019; Chansel et al., 2023).

La evaluación del desarrollo y calidad embrionaria *in vitro* permite seleccionar embriones viables (Scott, 2002; Tibary et al., 2015; Tibary et al., 2005) aptos para la transferencia que con mayor probabilidad resulten en una preñez (Nasiri y Yazdi, 2015). Buscando un sistema de incubación *in vitro* adecuada para el proceso de desarrollo embrionario temprano en alpacas que permita una evaluación sin perjudicar su desarrollo, se pretende comparar la capacidad de obtención de embriones a través de dos sistemas de incubación: continuo y convencional o clásico.

CAPÍTULO I

1. Problema de investigación

Los CSA son especies con una limitada capacidad reproductiva, el tiempo de gestación es larga obteniendo una sola cría al año lo que limita el mejoramiento genético del rebaño (Huanca, 2022; Ruiz, 2022; Brown, 2000). Los avances biotecnológicos como la manipulación y producción *in vitro* e *in vivo* (Laines et al., 2021; Tibary et al., 2015; Ruiz, 2022) permiten la obtención de crías genéticamente superiores a los padres (Arriaga et al., 2014). Pero en CSA principalmente en alpacas siguen siendo un desafío, en obtener embriones de excelente calidad debido a que no están consolidadas y tienen poca repetibilidad (Laines et al., 2021; Tibary et al., 2015; Ruiz, 2022) que en vacunos y ovinos (Ruiz, 2022).

La evaluación y selección embrionaria para la transferencia es un paso crucial que depende de la evaluación morfológica del desarrollo embrionario desde la segmentación y su posterior división celular hasta alcanzar al estadio de mórulas y blastocisto. Hasta la fecha, los resultados obtenidos con respecto al desarrollo embrionario temprano son pobres, principalmente porque la calidad del blastocisto producido *in vitro* no es tan buena como la de los blastocistos producidos *in vivo* (Trasorras et al., 2017).

La obtención y evaluación de embriones *in vitro* hasta el momento se realizan en un sistema clásico o sistema convencional que consiste en un seguimiento y evaluación interrumpida (fuera de la incubadora) ocasionando cambios bruscos en su medio entorno, como la temperatura, gases (CO₂), pH y humedad (Magata, 2023; Kovacs, 2014; Cívico et al., 2022) con muy pocos reportes acerca de FIV en alpacas (Sarzoza y Culcay, 2014, Ruiz, 2022). La introducción de incubadoras Time-Lapse System (TLS; sistema continuo) en los laboratorios de FIV permite la observación continua del desarrollo del embrión sin interrumpir las condiciones del medio de cultivo controladas y estables con imágenes instantáneas que podrían pasar por alto en las evaluaciones convencionales (Fryc et al., 2021; Zhan et al., 2016; Desai et al., 2018; Yang et al., 2018).

A pesar de muchas investigaciones y artículos en especies (humanos, ratones, vacunos, ovinos (Fryc et al., 2021; Sugimura et al., 2012; Huayhua et al., 2023; Cívico et al., 2022), hasta el momento la diferencia entre sistema convencional y continuo aún no está tan

esclarecida de cuál es el mejor sistema en obtener embriones de excelente calidad (Cívico et al., 2022; Sugimura et al., 2012; Rocha et al., 2016). Por las razones hasta aquí descritas se pretende comparar la capacidad de obtención de embriones *in vitro* de alpacas a través de dos sistemas de incubación: continuo y convencional o clásico.

CAPÍTULO II

Objetivos, Hipótesis y Justificación

2.1. Objetivos

2.1.1. Objetivo General

Comparar el desarrollo embrionario temprano *in vitro* de alpacas a través de un sistema convencional y continuo durante 168 horas pos fecundación.

2.1.2. Objetivos Específicos

Evaluar el desarrollo embrionario *in vitro* de alpacas obtenidas bajo un sistema convencional y continuo a las 48 horas pos fecundación.

Evaluar el desarrollo embrionario *in vitro* de alpacas obtenidas bajo un sistema convencional y continuo a las 120 horas pos fecundación.

Evaluar el desarrollo embrionario *in vitro* de alpacas obtenidas bajo un sistema convencional y continuo a las 168 horas pos fecundación.

2.2. Hipótesis de investigación

H1: No existe diferencias significativas en el desarrollo embrionario temprano *in vitro* de alpacas por el sistema convencional y el sistema continuo evaluadas por 168 horas pos fecundación.

H0: Existe diferencias significativas en el desarrollo embrionario temprano *in vitro* de alpacas por el sistema convencional y el sistema continuo evaluadas por 168 horas pos fecundación.

2.3. Justificación

Los CSA representan un desarrollo potencial para las zonas alto andinas del Perú que se encuentran aisladas y pobres en regiones como Puno, Huancavelica, Junín, Arequipa, Ayacucho y Cusco (Huanca, 2022; Ruiz, 2022; Brown, 2000) y la aplicación de la biotecnología en la producción de embriones es una herramienta valiosa que interviene

en la calidad y cantidad genética del rebaño (Landeo et al., 2022; Trasorras y Miragaya, 2016). En la producción de embriones tanto *in vivo* como *in vitro*, uno de los indicadores importantes de la calidad de un embrión son sus parámetros morfológicos que hoy en día existe una gran necesidad de evaluar el desarrollo embrionario temprano con un sistema que sea práctico, un método adecuado que no interfiera o altere la integridad del embrión (Stelletta et al., 2022).

Es de gran importancia tener un sistema para la evaluación del desarrollo embrionario (Stelletta et al., 2022), que tenga una de las ventajas de no exponer al embrión o buscar un sistema con una mínima exposición fuera de la incubadora cuya capacidad del sistema sea de mantener un entorno de cultivo estable (Armstrong et al., 2018; Cívico et al., 2022; Swain, 2014). Para obtener embriones con mayor potencial de desarrollo y calidad, que posteriormente consigan una implantación (Cívico et al., 2022). Con este trabajo de investigación se busca contribuir a los profesionales que trabajan con tecnologías en reproducción asistida (Stelletta et al., 2022), y determinar el mejor sistema de evaluación embrionaria *in vitro* contribuyendo el conocimiento de avances biotecnológicos en alpacas para el desarrollo de la población de CSA.

CAPÍTULO III

Marco Teórico

3.1. Antecedentes de la investigación

Huayhua et al. (2023), Concepción-Chile, investigación realizada en vacunos con objetivo de evaluar el tiempo de blastulación monitoreado por tecnología de lapso de tiempo para predecir la viabilidad *in vitro* de blastocistos bovinos. La procedencia de los COCs fue de ovarios del camal, la MIV, fecundación *in vitro* y cultivo *in vitro* se realizaron con un medio comercial. La MIV de COCs fue por 20-22 horas y la fecundación *in vitro* por 18 horas. Utilizaron el sistema time-lapse (sistema continuo) y un grupo control (sistema convencional) obteniendo un resultado de la primera escisión con 83.7% y 82.1% en 3 días pos fecundación y la tasa de blastocisto con 42,8% y 30.7% de embriones obtenidos por el sistema time-lapse y sistema convencional a los 7 días pos fecundación, con viabilidad del embrión de 39,58% y no viables 60.42%. Conclusión: los blastocistos de tiempo <155h y >180 um de diámetro maximizan su viabilidad *in vitro*.

Ahlström et al. (2022), Realizaron una investigación en 10 clínicas nórdicas en humanos. El objetivo de estudio fue determinar si, al realizar la selección y transferencia de embriones el día 5, un algoritmo TLS puede mejorar la predicción del potencial reproductivo del embrión en comparación con la morfología del embrión únicamente. La obtención de COCs fue de ovarios de pacientes con tratamiento (estimulación ovárica), divididas en 2 grupos (sistema continuo y convencional). Fecundadas y cultivadas *in vitro* en un medio de un solo uso a una temperatura de 37°C, 5% de CO₂. Resultados de clivaje de sistema continuo 61.5% y sistema convencional 60.1% sin ninguna diferencia estadística. Conclusión la tasa de embarazos de embriones obtenidos por sistema continuo no mejoro al sistema convencional.

Landeo et al. (2022), Huancavelica – Perú. El trabajo de investigación tuvo como objetivo comparar el desarrollo y calidad de COCs de alpacas vivas con COCs de alpacas beneficiadas. Para la obtención de COCs se realizó de dos maneras: 1-. COCs de ovarios procedentes del camal. 2.- COCs de alpacas vivas obtenidas por OPU. Evaluadas según su morfología, los del grado I, II y III fueron madurados *in vitro* por 26 horas, inseminadas con semen fresco, embriones cultivados por 7 días. Resultados: Evaluando el desarrollo

embrionario *in vitro* de alpacas en tres tiempos: COCs de ovarios de alpacas beneficiadas clivaje 48 horas (55.4%), mórula 96 horas (89%), blastocisto 120 horas (71%). COCs de alpacas vivas por OPU clivaje 48h (94,6%), mórulas 96h (94%), blastocistos 120 horas (94%). Conclusión: la obtención de COCs de ovarios de matadero fue mayor en la tasa y calidad de COCs. El desarrollo embrionario fue mayor de los COCs obtenidas por OPU.

Gandarillas et al. (2022), Tacna-Perú. Investigación con objetivo de evaluar 4 tiempos de maduración *in vitro* de COCs. Con ovario procedentes del camal, madurados *in vitro* por 26, 32, 38 y 42 horas, posteriormente inseminadas cultivadas por 7 días. Resultados en la maduración *in vitro* sin diferencia significativa y en la tasa de división fue de $45.7 \pm 3.5\%$, $51.3 \pm 10.2\%$, $52.8 \pm 5.6\%$ y $50.9 \pm 3.1\%$ sin diferencia estadística entre tratamientos ($p > 0.05$) y la tasa de blastocistos fue de $20.5 \pm 3.4\%$, $30.5 \pm 5.8\%$, $21.2 \pm 2.5\%$ y $22.8 \pm 3.5\%$ para 26, 32, 38 y 42 h. Conclusión el tiempo indicado para la MIV de COCs sería 32h.

Laines et al. (2021), Ayacucho-Perú, objetivo de investigación fue evaluar el efecto de dos medios de cultivo en la producción de embriones *in vitro* en alpacas (*Vicugna pacos*). Los Ovarios son transportados a temperatura de $10.52\text{ }^{\circ}\text{C}$, seleccionando a COCs de calidad I, II y III, madurados por 32 horas, fecundadas por 18 horas con espermatozoides del epidídimo. Al final fueron cultivados los presuntos cigotos en 2 tipo de medios diferentes: KSOMaa (medio optimizado simple de potasio) y SOFaa (medio de fluido oviductal sintético) por 7 días a una temperatura de $38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$, $5\% \text{ O}_2$ y 90% de humedad. Resultados embriones excelentes 8.49% y 12.25% , calidad bueno 5.87% y 6.96% , calidad regular 6.82% y 6.35% y calidad Mala 9.16% y 13.63% ($P > 0.05$). En conclusión, los medios de cultivo SOFaa y KSOMaa se pueden utilizar en el proceso de cultivo *in vitro* de alpacas.

Chera-aree et al. (2021), Tailandia, trabajo de investigación realizado en humanos. Objetivo comparar los resultados del embarazo de la fertilización *in vitro* con transferencia de embriones entre embriones cultivados en un sistema de monitoreo de lapso de tiempo (TLS) y aquellos cultivados en una incubadora convencional (CI). La obtención de COCs fue por la técnica OPU de ovarios estimuladas, fecundadas y cultivadas a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $6\% \text{ CO}_2$. Resultados La tasa de clivaje no se encontró una diferencia entre el sistema continuo $71,84\%$ y sistema convencional

79,28%. Conclusión embriones del sistema de monitoreo de lapso de tiempo o sistema continuo fue mejor que el sistema convencional en la tasa de embarazos e implantación, pero aún se necesita mayores estudios.

Palomino et al. (2020), Apurímac, Perú. Objetivo fue evaluar el efecto de la heparina y PHE (penicilamina, hipotaurina y epinefrina) en el medio de fecundación en la producción *in vitro* de embriones en alpacas. Ovarios transportados (3 horas) en solución salina a 37 °C, selección de COCs de grado I, II y III madurados por 34h, luego distribuidas en 4 grupos para la fecundación (grupo control, grupo con heparina, grupo con PHE y grupo con PHE y heparina, inseminadas con 1×10^6 espermatozoides/mL incubados por 18h, cultivados en medio SOF por 7 días. Resultados el desarrollo y calidad embrionaria de alpacas por el sistema convencional en dos tiempos: 24 horas de incubación obtuvo 30(16.53%) de clivaje y el día 7 después de la fecundación *in vitro* obteniendo mórulas 43(24.73%) y blastocisto de 7(3.60%). Y la calidad embrionaria observaron el día 7 con resultados de excelente 29(56.9%), bueno 16(31.4%), regular 5(9.8%), malo 1(2.0%). Conclusión, el uso de la heparina y PHE + Heparina en medio de fecundación incrementa la producción *in vitro* de embriones de excelente calidad.

Barberet et al. (2018), Francia, Investigación en humanos con objetivo de estudiar si el sistema de cultivo cerrado, en comparación con una incubadora de mesa con condiciones de cultivo similares, tiene un impacto positivo en los resultados de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Los COCs obtenidas por OPU son divididas en 2 grupos, el primer grupo para cultivo de embriones en sistema convencional y el segundo grupo para el cultivo de embriones *in vitro* de sistema continuo. Resultado: segmentación 23.6% < 4 células, 50.5% 4 células, 25.9% > 4 células por sistema convencional y 14% < 4 células, 57.7%, 4 células, 28.3% > 4 células por sistema continuo y en la segunda evolución con 46.2% < 8 células, 26.6% 8 células, 25.3% > 8 células y 1.9% mórulas por sistema convencional; 35.4 % < 8 células, 26.7% 8 células, 34.3% > 8 células, 3.6% mórulas por sistema continuo. Conclusión obteniendo una diferencia significativa a favor del sistema de incubación continuo en el desarrollo embrionario *in vitro*.

Pérez et al. (2017), Puno-Perú. Objetivo de investigación fue evaluar el efecto del cultivo *in vitro* e *in vivo* de los cigotos de alpacas producidos *in vitro*. Los COCs fueron obtenidas

de ovarios del camal que fueron expuestos al 0.9% de solución salina y antibiótico. Aspirados de 2 a 6 mm de folículos, madurados por 36 horas evaluar el efecto del cultivo *in vitro* e *in vivo* de los cigotos de alpacas producidos *in vitro*. Con 226 COCs de ovarios obtenidas del camal, madurados por 36 horas y cultivadas en medio de SOFaa a 38.5 °C, bajo 5% de CO₂ y en el oviducto de las alpacas. Resultados, por el sistema convencional a las 48 horas un clivaje de 30 (27.5%), 120 horas 19 (17.4%) de mórulas, 168 horas 7 (6.4%) de blastocisto y los embriones recuperados del oviducto de la alpaca 3 blastos eclosionados, 5 blástulas 2 blástulas colapsadas. Conclusión: la producción embrionaria de *in vitro* e *in vivo* se pueden utilizar.

Contreras et al. (2014), Ayacucho-Perú. Investigación realizada con el objetivo de evaluar la calidad de embriones producidos a partir de la fertilización *in vitro* en alpacas (*Vicugna pacos*). Los COCs fueron obtenidas de ovarios procedentes del matadero, aspirados de folículos >3mm <8mm, los COCs aptos para la MIV fueron del grado I y II madurados por 32h a 37 °C, 5% O₂ y 5% CO₂. Los COCs maduros fueron divididas en 2 grupos: 1.- COCs maduros inseminadas con espermatozoides epididimarias lavadas por la técnica de Percoll. 2.- COCs maduros inseminadas con espermatozoides epididimarias lavadas por la técnica de Swin up. Embriones cultivados por 7 días y evaluadas de acuerdo a lo establecido por la Sociedad Internacional de Tecnología Embrionaria (IETS). Los embriones se clasificaron de excelente a intransferible. Obteniendo los siguientes resultados 5.35% excelente, 9.53% buena, 3.02% mala e intransferible. Conclusión los embriones obtenidos según la técnica de lavado de espermatozoides son similares sin ninguna diferencia, los embriones aptos para la transferencia son los excelentes buenos y regulares.

Kahraman et al. (2013), Estambul en humanos. Objetivo fue comparar el desarrollo de blastocistos y los resultados del ciclo de pacientes con transferencia electiva de un solo embrión de buen pronóstico utilizando incubadoras convencionales o de lapso de tiempo (sistema continuo). Pacientes divididos en 2 grupos, primer grupo 31 pacientes para sistema convencional y el segundo grupo 33 pacientes para sistema continuo. Ambos pacientes de sistemas (convencional y continuo) son sometidas a una estimulación ovárica con hormonas, la obtención de COCs se realizó en ambos grupos para la fecundación *in vitro* posteriormente cultivadas n una placa Petri en medio (comercial) de un solo paso (medio sin cambio) a 37 °C, 5 % de O₂ y 6 % de CO₂ comparando 2 sistema de producción

embrionaria. Resultados en la segmentación 91,38% de sistema convencional 82,28% por sistema continuo del último estadio (blastocisto) 43.7% y 39.7% para los sistemas convencional y continuo, concluyendo en que ambos sistemas de incubación son similares.

Kirkegaard et al. (2012), Hospital- Dinamarca investigación realizada en humano con objetivo de evaluar la seguridad de una incubadora de lapso de tiempo disponible comercialmente. Con COCs obtenidas por la técnica de OPU un sistema time- lapse frente a un incubador convencional con criterios de valoración en proporción de embriones de 4 células (día 2), 7 a 8 células (día 3) y proporción de blastocisto, donde la tasa de blastocisto fue de 24,9 % en la incubadora de lapso de tiempo y 23,2 % en la incubadora convencional sin ninguna diferencia entre ambos sistemas. Conclusión la obtención de embriones *in vitro* para la transferencia se pueden realizar en sistema de incubación convencional y el sistema de incubación de lapso de tiempo (sistema continuo).

3.2. Revisión bibliográfica

3.2.1. Biotecnología reproductiva

La FIV es una técnica de reproducción asistida (TRA) que consiste en un procedimiento desde la manipulación, selección y un control de temperatura ambiental de ovarios, ovocitos, espermatozoides y embriones por médicos en un laboratorio equipado que tengan altos estándares de calidad en los protocolos de FIV de avance científico y tecnológico (Gandarillas y Quispe, 2021; Laines et al., 2021; Herradon et al., 2007). La FIV es la fecundación extracorpórea que quiere decir fuera del cuerpo femenino (Bagnarella, 2015), en un ambiente seguro con el fin de obtener cigotos viables, susceptibles a implantarse en madres receptoras (Climent et al., 2000).

El desarrollo embrionario es un proceso que inicia con la división del cigoto generando un aumento del número de células denominadas blastómeras, que están en constante división, desde dos células, 4 células, hasta el desarrollo de una mórula y el último desarrollo es la formación de un blastocisto, previo a la implantación en el útero materno (Bagnarella, 2015).

Los avances biotecnológicos en la PIV son una herramienta útil en el mejoramiento genético, permiten la preservación de la especie, podrían evitar el contagio o la

transmisión de algunas enfermedades, obtener crías de hembras con altos estándares genéticos, de alpacas con problemas reproductivos (infértiles) a través de fertilización *in vitro* (FIV) y transferencia embrionaria a especies con buena salud reproductiva. (Huanca et al., 2007; Palma, 2008; Bó y Mapletoft, 2013; Brown, 2000; Gamarra, 2008; Ruiz, 2022; Gonzáles y Gonzáles, 2005).

3.2.2. Maduración *in vitro* de COCs

3.2.2.1. Maduración ovocitaria

Los ovocitos son gametos femeninos con la mitad del material genético de la madre, son células haploides al combinarse con el material genético del gameto masculino se produce una célula diploide (Boeta et al., 2018). El ovocito u ovulo se forma dentro del ovario en los folículos ováricos por un proceso denominado ovogénesis y en relación con la foliculogénesis, los óvulos tienen las siguientes características son: voluminosa, inmóviles y con citoplasma abundante rico en nutrientes, ADN y ARN (Climent et al., 2000).

La ovogénesis es un proceso donde las células germinales empiezan a proliferar por mitosis, dando como resultado a las ovogonias diferenciándose en ovocitos primarios que empiezan con su división meiótica, deteniéndose en la fase de profase meiótica durante la vida fetal, en la pubertad los ovocitos primarios que se encuentran en la fase profase meiótica algunos reanudarán su desarrollo concluyendo su primera división meiótica dando como resultado a un ovocito secundario y aun cuerpo polar como se observa en la Figura 1 (Boeta et al., 2018).



Figura 1: Ovocito inmaduro

Fuente: Bonilla et al., 2009

Nota: ovocito con citoplasma normal, ausencia de corpúsculo polar.

3.2.2.2. Maduración *in vitro* de ovocitos

Para la maduración *in vitro*, los ovarios son obtenidas de alpacas beneficiadas a temperatura de 37 °C en un envase térmico, para posteriormente obtener ovocitos mediante la mediante la aspiración del líquido folicular con la ayuda de una jeringa y una aguja (Pérez et al., 2017; Arriaga et al., 2014; Hafez y Hafez, 2002) o mediante la técnica de Slicing que consta en realizar unos cortes en la superficie del folículo para proporcionar la liberación del ovocito. Otra forma de obtener ovocitos es mediante la aspiración de folículos guiada por ecografía transvaginal (OPU) (Ruiz, 2018; Lorenzo, 1992) y por laparotomía (cirugía), estas 2 ultimas se realizan en alpacas vivas que puedan tener problemas reproductivos, pero tienen un gran valor genético (Berland et al., 2011; Giuliano y Trasorras, 2011)

La maduración *in vitro* consiste en simular el tiempo transcurrido en el folículo, principalmente en los procesos metabólicos que ocurre en forma natural del ovocito dentro del folículo dominante, entre el pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH) hasta que se produce la ovulación (Ruiz, 2008). Los ovocitos obtenidos para la fecundación *in vitro* se encuentran en un estadio de vesícula germinal (ovocito inmaduro) Figura 1, que requieren de maduración artificial o maduración *in vitro* para

llegar a la fase de metafase II (Gandarillas y Quispe, 2021; Ruiz, 2008), en esta etapa se reactiva la división meiótica de diploteno (profase I) de la primera división hasta alcanzar la metafase II de la segunda división meiótica donde el ovocito es expulsado del folículo de una forma natural, el ovocito se mantiene en esta etapa hasta ser fecundado por el espermatozoide hasta ser activado artificialmente en el laboratorio para producir embriones de calidad (Ruiz, 2008).

Los ovocitos que son recuperados de los ovarios son seleccionados y agrupados de acuerdo a su número de capas de Complejo ovocito-cumulos (COCs) tal como se describe en la Tabla 1 (Ratto et al., 2005; Bertoldo et al., 2010). Están divididas en 4 categorías o grados, los ovocitos viables para la maduración *in vitro* se aceptan del grado I, II (Huanca et al., 2014) y III (Palomino et al., 2020), donde las de buena calidad son aquellas con más de una capa de células del cúmulo y citoplasma oscuro homogéneo (Khatir et al., 2005) el resto se descarta, la MIV se realiza a una temperatura de 38.5 ° C por 28 – 36 horas (Gandarillas y Quispe, 2021).

Tabla 1

Descripción morfológica de Complejo Ovocito-Cumulo (COCs)

Grados de COCs	Descripción
Grado I	Los COCs tienen más de tres capas de células del cumulus compactas con un citoplasma homogéneo.
Grado II	En este grado los COCs tendrán de 2 a 3 capas de células del cumulus con un citoplasma homogéneo.
Grado III	Los COCs con una capa de células del cumulus, otros son parciales o totalmente desnudos y con citoplasma heterogénea, con presencia de las vacuolas.
Grado IV	COCs sus células de los cúmulos son expandidos, citoplasma granular.

Nota: Clasificación de ovocitos de acuerdo a su número de capas y citoplasma.

Fuente: Bertoldo et al. (2010).

3.2.2.3. Medios de maduración *in vitro* de ovocitos

Los medios de maduración utilizados son clasificados en dos tipos: Medios simples y medios complejos. El medio simple contiene una solución salina fisiológica bufferada se añade habitualmente bicarbonato y adicionada de piruvato, lactato y glucosa. El medio de maduración complejo además de los constituyentes del medio simple esta constituidas por los aminoácidos, vitaminas, purinas y entre otras sustancias encontradas que son asociadas al suero (Gordon, 2003). Uno de los más empleados en bovinos son los que están compuestos por las sales de Earl' asociadas con HEPES y con bicarbonato con estabilizantes del pH suplementado con el piruvato, aminoácidos, vitaminas y proteínas como la albúmina bovina o el suero SOF (Herradon et al., 2007).

En la actualidad los medios de maduración *in vitro* de ovocitos están constituido por TCM-199 que esta suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB), 0.5 µg/mL de la hormona folículo estimulante (FSH), 10 µg/mL de gonadotropina coriónica humana (hCG), 0.2 mM de piruvato de sodio, 50 µg/mL de un antibiótico (gentamicina) y 1 µg/mL de estradiol, son incubadas durante 26 a 48 horas de los gametos recolectados del camal a una temperatura de 38.5 °C (Huanca et al., 2014; Herradon et al., 2007; Landeo et al., 2022). Para mantener el ambiente de los ovocitos dentro de la incubadora la atmósfera de CO₂ es de 5% con una temperatura de 38.5 °C a 39 °C (Sarzos y Culcay, 2014).

3.2.2.4. Ovocitos maduros *in vitro*

Las características principales de un ovocito maduro es la presencia del corpúsculo polar el segundo corpúsculo polar aparece al momento de ser fecundado (Climent et al., 2000; Landeo, 2022). Los ovocitos en la maduración *in vitro* experimentan una serie de procesos como la maduración nuclear, citoplasmática y la expansión de las células del cumulus tal como se ve en la Figura 2 (Tibary et al., 2005).

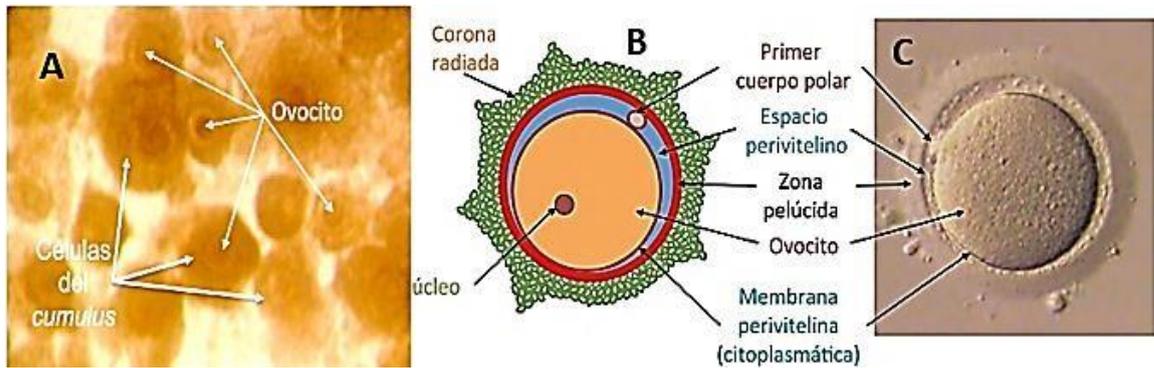


Figura 2. Características de un ovocito maduro

Fuente: (Boeta et al., 2018).

Nota: En la figura A se muestra ovocitos con varias capas de células de la granulosa formando los complejos de células del cumulus, figura B y C describen a un ovocito maduro por la presencia de su cuerpo polar.

3.2.3. Lavado y capacitación de espermatozoides

Los espermatozoides se obtienen por: electro eyaculación, mediante la vagina artificial, pos eyaculación, castración (cirugía) todas estas técnicas se realizan en alpacas vivas. Se pueden extraer testículos de alpacas beneficiadas en el camal, dentro del laboratorio se ubica la cola del epidídimo (Huanca et al., 2014). Una vez obtenidas los espermatozoides son seleccionados según su alto porcentaje de motilidad progresiva y cuando el semen está congelado su motilidad se estimula por métodos físicos por la técnica de nado ascendente, por la técnica de gradiente de densidad de percoll, agentes químicos como cafeína y teofilina (Hafez y Hafez, 2002), la técnica del Swim-up y para espermatozoides del epidídimo se utilizan las técnicas incluyendo la técnica de washing o lavado (Contreras et al., 2014; Mellisho et al., 2014).

Estas técnicas seleccionan del plasma o diluyente seminal lo que permite obtener un mayor porcentaje de espermatozoides motiles (Contreras et al., 2014). La técnica de Swim-up permite obtener un porcentaje elevado de espermatozoides móviles y con una morfología adecuada, requiriendo que los espermatozoides tengan una motilidad progresiva, la selección de los espermatozoides se basa en su capacidad de pasar del semen al medio fresco. Este método tiene como ventaja de no exponer a sustancias que podrían ser tóxicas para los espermatozoides, es de bajo costo y de fácil preparación en

el laboratorio (Santa Cruz et al., 2016).

Climent et al. (2000), nos indica que la capacitación de espermatozoides es un proceso de cambio fisiológico por la acción de medios existentes en el tracto reproductor de la hembra que les permitirá atravesar la zona pelúcida, al momento de la capacitación se presentan fenómenos como:

- Eliminación del factor de discapacitación este factor se encuentra en las secreciones o fluidos epididimarios, plasma seminal, suero homólogo, yema de huevo, otros líquidos fisiológicos que están unidas en los receptores de la membrana del espermatozoide impidiendo la liberación de enzimas acrosómicas, se elimina este factor por la centrifugación.
- Cambio en su estructura de los lípidos de la membrana del espermatozoide por la acción de la albumina que se encuentra en el tracto reproductor femenino esta acción hace que el colesterol baje o se pierda como resultado el espermatozoide tendrá un ablandamiento de la membrana.
- Activación de la acrosina por una glucoproteína, la acrosina es una proteasa similar a la tripsina que se encuentra en estado de inactivo.

Los componentes de estos agentes son la albumina sérica bovina (BSA), lipoproteínas de alta densidad (HDL) permite que los agentes incapacitantes como el colesterol que está ubicada en la cabeza espermática sean liberadas. La heparina desencadena la capacitación *in vitro* en bovinos que finalizará con la correcta reacción acrosómica y la penetración. También se encontró el uso de la catecolamina adrenalina y hipotaurina incrementan la penetración (Herradon et al., 2007; Hafez y Hafez, 2002). La capacitación espermática se realiza por un medio de fuerza de iónica elevada, ionóforo de Ca², cafeína, incubación prolongada de 18 a 24 horas, con un pH elevado (Hafez y Hafez, 2002).

3.2.4. Fertilización *in vitro* de alpacas

Fecundación o fertilización consiste en la activación del gameto femenino por la fusión o unión de dos gametos (un gameto macho y un gameto hembra), es un proceso que consiste en la entrada de un espermatozoide a un ovocito maduro atravesando la corona

radiada y la membrana o zona pelúcida hasta llegar a la membrana citoplasmática (paso A, Figura 3; García y Gil, 2013; Salazar, 2015), en este paso los gránulos corticales que se encuentran ubicadas en la periferia de su citoplasma en la superficie de la membrana del ovocito, migran liberando todo su contenido al espacio perivitelino inmediatamente o al momento de la penetración del espermatozoide la membrana vitelina y la zona pelúcida se modifican impidiendo o evitando la entrada a más de uno de espermatozoides de esta forma se evita la poliespermia, el producto se denominado cigoto. El cigoto o huevo tiene la forma redondeada de tamaño entre 100 y 140 μm , con tamaño máximo de 35 μm de diámetro (Bagnarella, 2015; Boeta et al., 2018; García y Gil, 2013).

El ovocito fecundado empieza a reanudar la segunda división meiótica, la aparición del segundo cuerpo polar y la formación de 2 pronúcleos un pronúcleo femenino y uno masculino dentro de 3 a 5 horas recuperando el número cromosómico del futuro individuo (paso B, Figura 3; Boeta et al., 2018). La unión de los gametos genera una mezcla de la información genética contenida en los pronúcleos masculino y femenino, los pronúcleos (femenino, masculino) migran y se disuelven sus membranas y los cromosomas de ambos se condensan y se unen forman un cigoto (paso C, Figura 3) con la finalidad de crear un individuo (Salazar, 2015; Boeta, et al., 2018; Sarzosa y Culcay, 2014; Climent et al., 2000).

La fertilización *in vitro* quiere decir reproducir en el laboratorio con el fin de obtener cigotos viables susceptibles a implantarse en madres receptoras y continuar con su desarrollo embrionario (Climent et al., 2000; Gandarillas y Quispe, 2021). Se realizan en una placa de medio de cultivo, es aquí donde se fusionan los gametos, el espermatozoide atraviesan las barreras que presenta en el ovocito como las células del cúmulus, la zona pelúcida y la membrana plasmática desencadena una serie de eventos que concluye en la fecundación (Hafez y Hafez, 2002; Salazar, 2015).

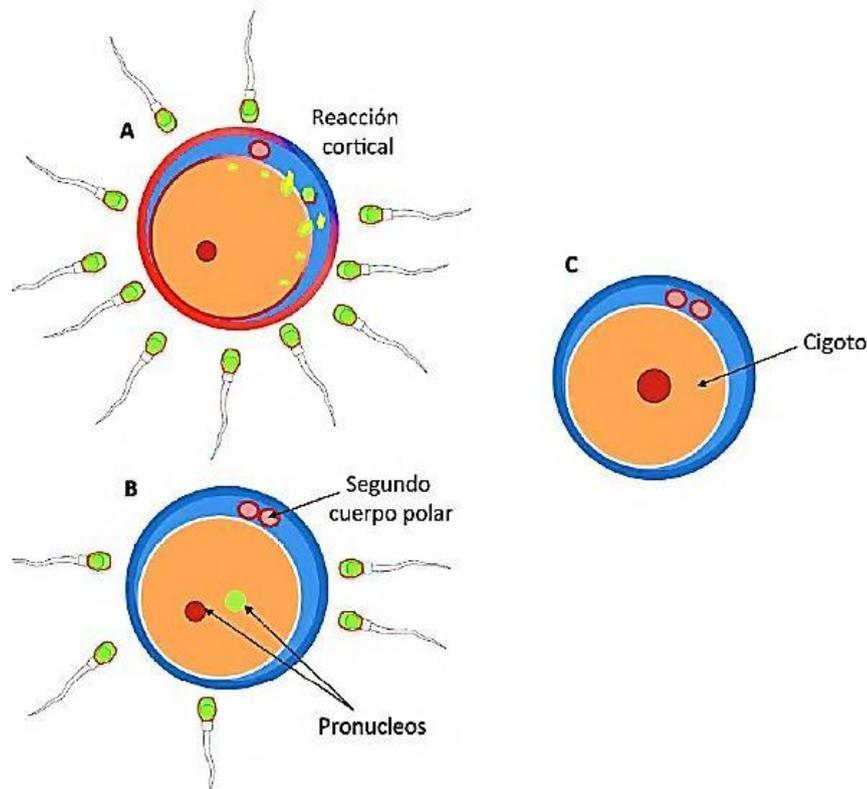


Figura 3. Proceso de la fertilización

Fuente: (Boeta et al., 2018).

Nota: Paso A muestra el momento de la interacción entre un ovocito y el espermatozoide, el paso B y la C demuestran la formación de un cigoto.

3.2.4.1. Medio de fertilización *in vitro*

El proceso de fertilización *in vitro* requiere de un medio como FER-TALP que la TA son Tyrode/albumina (Bicarbonato de sodio 25 mM y albúmina de suero bovino) y LP contiene lactato de sodio, piruvato de sodio con diferentes cantidades de fuentes de energía como lactato, piruvato, albúmina sérica, glucosa, proteínas, en algunos casos se añade heparina al medio directamente ajustando la concentración (Herradon et al., 2007; Gordon, 2003). Formando de 5-7 gotas en una placa con 50ul/gota del medio de FER-TALP o en pocillos de cultivo con o sin heparina de 10 ug/mL para cada gota, cubiertas con aceite de parafina. Los espermatozoides se preparan mediante una de las técnicas de lavado y selección de acuerdo a la procedencia de estas (semen fresco, semen congelado o del epidídimo), la suspensión espermática se realiza con una

micropipeta formando de 25 uL cada gota de 5-7 COCs, se incuban con 5% de CO₂ y 95% de aire con un alto índice de humedad a una temperatura de 39 °C durante 24 horas (Hafez y Hafez, 2002).

3.2.5. Desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario consiste en las divisiones mitóticas del cigoto a pocas horas de la fecundación que es conocida como segmentación (clivaje), las divisiones empiezan de una célula (cigoto) Figura 4 a un embrión multicelulares (Boeta et al., 2018) Figura 8, (García y Gil, 2013; Bagnarella, 2015). Las partes de un cigoto se describe en la Figura 4, empieza con las divisiones 2, 4, 8, 16 y 32 células denominada blastómeros, son sincrónicas a media que va avanzando con las divisiones mitóticas se van volviendo asincrónicas. Se les denomina divisiones de segmentación esto se debe a que se realizan sin el aumento del citoplasma, de manera que cada división de los blastómeros se va haciendo más pequeño, desde la división de 16 células el embrión se conoce como mórula se aprecia como una masa celular compacta, esta compactación se debe a la formación de proteínas de unión entre los blastómeros (Boeta et al., 2018; Hafez y Hafez, 2002; García y Gil, 2013).

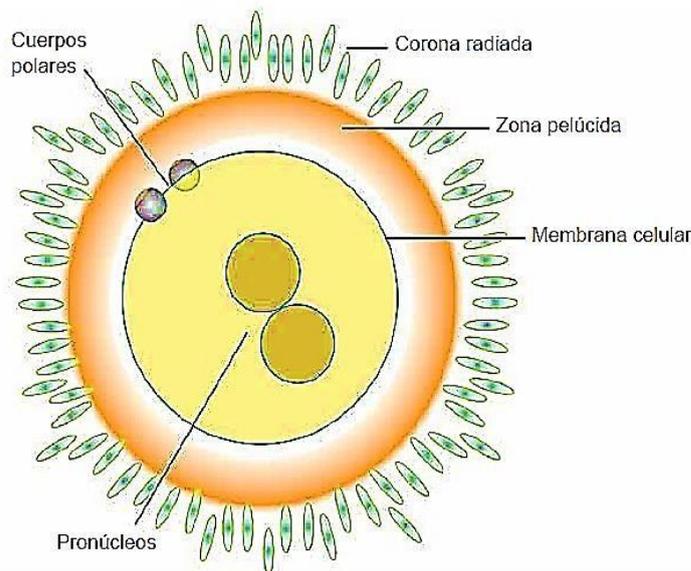


Figura 4. Cigoto y sus partes

Fuente: (Boeta et al., 2018).

Nota: Cigoto de mamífero con 2 corpúsculos polares y sus pronúcleos masculinos y femeninos.

Primera división mitótica: El cigoto se divide en 2 células (2 blastómeras) idénticas que ocurre alrededor de 20 a 30 horas después de la fecundación, sin el aumento de la masa celular Figura 5 (Boeta et al., 2018; Hafez y Hafez, 2002).

Segunda división mitótica: de las 2 blastómeras se divide en 4 blastómeras idénticas, esta división ocurre entre 12 a 24 horas dependiendo a la especie, sin alterar el volumen del citoplasma, Figura 5 (Boeta et al., 2018; Hafez y Hafez, 2002).

Tercera división mitótica: las 4 células hijas idénticas se divide en 8 células hijas idénticas sin alterar el volumen del citoplasma en 4 días dependiendo al tipo de especie, Figura 5 (Boeta et al., 2018; García y Gil, 2013).

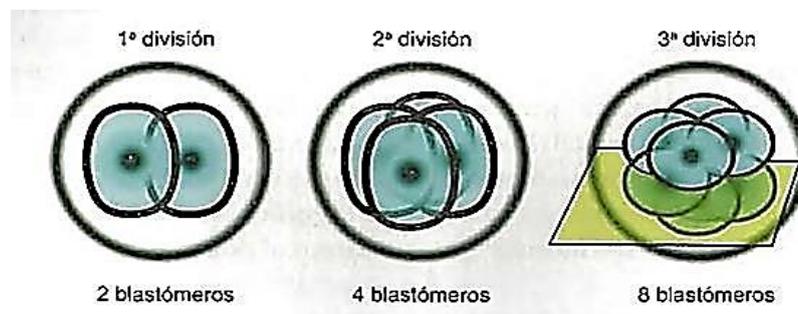


Figura 5. División de blastómeros de la primera división, segunda

Fuente: García y Gil, 2013.

Cuarta división mitótica o mórula: La cuarta división es conocido como mórula por su parecido a una mora (latín morus: mora) se domina desde 16 a 32 células, los blastómeros son complicados para diferenciarse una de la otra, la masa celular ocupa la mayoría del espacio perivitelino en el embrión sin la alteración el volumen del citoplasma. Una mórula compacta es debido al aplastamiento de los blastómeros individuales tienen una masa compacta que ocupa el 60 a 70 % del espacio perivitelino del embrión debido a que se establecen uniones distintas entre células o blastómeras Figura 6 (Boeta et al., 2018; Hafez y Hafez, 2002), a esta etapa llegan entre 4-5 días (Picha et al., 2013).

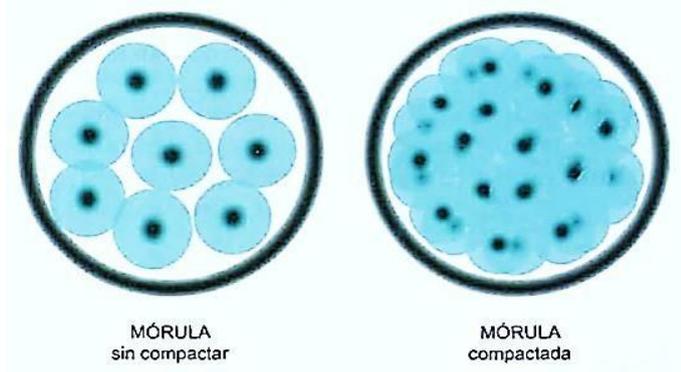


Figura 6. Cuarta división mórula.

Fuente: García y Gil, 2013.

Blastocisto: que va desarrollándose adecuadamente por la multiplicación de las células y la acumulación de líquido en el interior y la formación de una cavidad denominada blastocele este proceso se conoce como blastulación, el blastocisto aumenta de tamaño convirtiéndose en blastocisto expandido y la zona pelúcida se va adelgazando y finalmente el embrión eclosiona, es decir es liberado de la zona pelúcida en blastocisto temprano se observa en el embrión una formación de una cavidad llena de fluidos y esto da una apariencia general como un anillo, el embrión ocupa entre el 70 a 80% del espacio perivitelino, esta es la fase de transición de una mórula tardía a un blastocisto (Sarzos y Culcay 2014; Boeta et al., 2018; Hafez y Hafez, 2002).

En el desarrollo del blastocisto hay una diferenciación de una capa externa denominada trofoblasto son células superficiales (células cuboides) o trofoectodermo del cual se origina la mayoría de las membranas fetales y la masa celular interna (MCI) o embrioblasto o el botón embrionario que dará origen al embrión posteriormente al feto, que es más compacta y oscura, el blastocele se ve bien prominente con el embrión ocupando la mayor parte del espacio perivitelino. Las principales capas germinales el ectodermo, mesodermo y endodermo se originan de la MCI (Figura 7) (Boeta, et al., 2018).

El blastocisto eclosionado o liberado por la expansión completa del embrión, rompe la zona pelúcida luego se libera, este embrión liberado es redondeado hasta el doceavo día, después rápidamente aumenta de tamaño (Boeta et al., 2018). Ocurre en el útero ente 4 - 8 días después de la ovulación dependiendo a la especie (Hafez y Hafez, 2002).

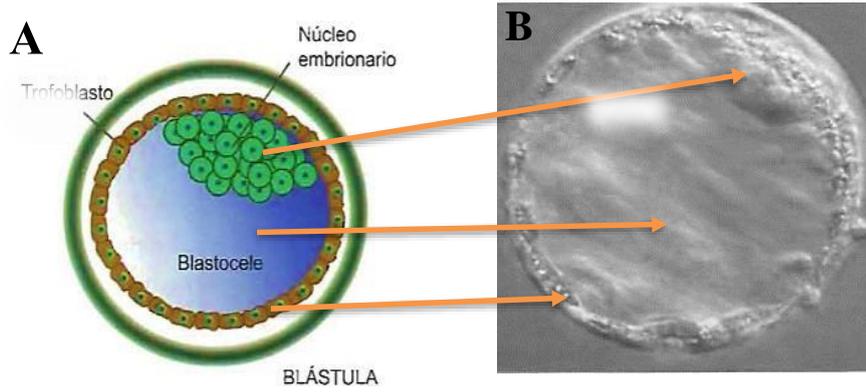


Figura 7. Componentes del blastocisto

Fuente: García y Gil, 2013.

Nota: A) describe las partes de un blastocisto. B) embrión del día 7 de la especie porcino.

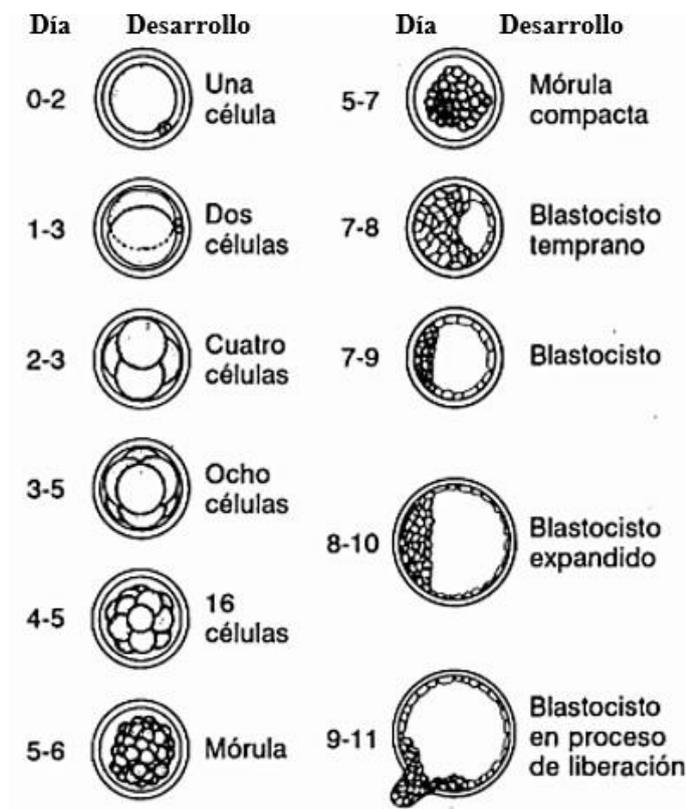


Figura 8. Etapas del desarrollo embrionario de vacunos.

Fuente: Geisert y Malayer, 2002.

3.2.5.1. Medio de cultivo *in vitro* de embriones (CIV)

El cultivo de los cigotos para su desarrollo *in vitro* generalmente se usan medios como el fluido de oviducto sintético (SOF; Palomino et al., 2020), fluido de oviducto sintético modificado (SOFM), medio optimizado simple de potasio (KSOM), Charles Rosenkrans (CR1) y Chatot Ziomek Bavister (CZB). El medio que más se utiliza en el cultivo de embriones *in vitro* es el medio SOF en todas las especies, se caracteriza por tener sus bajos niveles de sodio y con altos niveles de potasio, donde el calcio y potasio son importantes para el desarrollo embrionario, la falta de estos minerales como el calcio reduce en el proceso de la división embrionaria y una incapacidad para la compactación de las mórulas el medio adecuado para que se realice el cultivo de embriones de alpacas es SOF CIV y KSOM (Guillen, 2018; Ruiz, 2018).

Los cigotos se colocan por 7 días en un medio de cultivo de 10 a 15 cigotos en 50 uL que son cubiertos con aceite mineral, el fluido oviductal sintético (SOF) es suplementado con un 2% (v/v) de aminoácidos esenciales, 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales con 50 ug/mL de gentamicina más 5% de suero fetal en los 4 primeros días de cultivo y el 1% en 3 días siguientes. La incubación se realiza a 38.5 °C con una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. El cambio del medio se realiza cada 48 horas (Pérez et al., 2017).

3.2.6. Evaluación embrionaria bajo un sistema convencional.

3.2.6.1. Evaluación de embriones

La evaluación de los embriones en otras especies como en los bovinos, normalmente se realiza con un microscopio estereoscópico que va de un aumento de 20 hasta 100X, con el embrión en un recipiente pequeño, es necesario que este "rodando" en el fondo del plato para observar la zona pelúcida desde diferentes perspectivas. Al momento de observar se debe enfocarse en: Un embrión que sea compacto y esférico y los blastómeros deben tener un tamaño similar con una textura y color uniforme, su citoplasma no debe ser granular ni vesiculado, con el espacio perivitelino despejado y no contener restos celulares para que el embrión pueda determinarse como viable, en cuanto a su zona pelúcida debe ser uniforme; sin grieta y, no contiene restos en su superficie. Los sistemas de codificación estandarizados son para su uso en la descripción y desarrollo de cada etapa del desarrollo embrionario y la calidad del

embrión. El código para cada etapa de desarrollo está determinado por números que va desde "1", un ovocito no fertilizado o un embrión de una célula hasta "9", el blastocisto eclosionado en expansión (Bó y Mapletoft, 2013).

3.2.6.2. Equipos

Para la evaluación de embriones se realiza con ayuda de un estereoscopio sobre la platina térmica observando todas sus estructuras, especialmente su zona pelúcida, según la clasificación en base a su aspecto morfológico (Paredes, 2014). La estimación embrionaria cuantitativa es el número de embriones que se desarrollan en los diferentes instantes del cultivo (Palma, 2008). Para la clasificación de embriones recuperados, la IETS (1998) establece cuatro categorías (Tabla 2), para ello se toma en cuenta estos siguientes parámetros morfológicos: Forma del embrión, número y compactación de las células, color y textura del citoplasma celular, variación del tamaño de las células, tamaño del espacio perivitelino, número y el tamaño de las vesículas, presencia de blastómeros degeneradas y extraídas, apariencia de la zona pelúcida (Mendoza, 2012; Skidmore, 2000; Tibary et al., 2015) en camellos el sistema de evaluación utilizado por la mayoría de los autores clasifica a los embriones en 5 grados según sus características morfológicas y estadio de desarrollo.

La clasificación y la evaluación de embriones de alta calidad se determinan mediante la estructura de su morfología según el Manual IETS descritas por Bo y Mapletoft (2013), las clasifico en 4 grados tal como se muestra en la Tabla 2, esta clasificación es para la evaluación de embriones *in vitro* en vacunos, pero también se utilizó para camélidos sudamericanos para determinar la calidad del embrión (Laines et al., 2021; Contreras et al., 2021; Tibary et al., 2015).

3.2.7. Evaluación embrionaria bajo un sistema de evaluación continua.

3.2.7.1. Evaluación Embrionaria

Los avances biotecnológicos en laboratorios de FIV han propuesto varios sistemas o alternativas para la manipulación y evaluación de embriones (Overström, 1996; Hoshi, 2003; Held et al., 2012; López et al., 2008), que permitan una evaluación como: la calidad del crecimiento *in vitro* de los embriones, la integridad de la membrana del blastómero (Overström, 1996), el análisis del metabolismo embrionario (Rondeau et

al., 1995; Thompson et al., 2016; Overström, 1996), la medición del consumo del oxígeno de los embriones, la cinética del desarrollo embrionario (Desai et al., 2014). Con equipos de microscopio electrónica, que es un predictor de la viabilidad del embrión (Hoshi, 2003), el análisis de microscopía electrónica de barrido (microscopía confocal; López et al., 2008; Palma, 2008) que evalúan los índices de birrefringencia de la zona pelúcida (Held et al., 2012). Más recientemente, y especialmente para embriones humanos, se encuentran con una tendencia hacia métodos que evalúan la cinética del embrión y la simetría de escisión utilizando sistemas de TLS (Montag et al., 2013; Kovacs, 2014; VerMilyea et al., 2014).

Los sistemas que permiten un desarrollo con una evaluación de embriones como TLS es una inteligencia artificial que va aumentando e introduciéndose en los laboratorios de FIV con buenos resultados y que favorecen un estudio o investigación minucioso de embriones antes de la transferencia embrionaria, con buenos resultados en la implantación, actualmente la especie con mayor ventaja en la utilización de este tipo de sistemas es en humanos (Cívico et al., 2022).

3.2.7.2. Equipos

El método continuo o sistema de seguimiento de lapso de tiempo (en inglés Time Lapse Sistema) consiste en tecnologías que son de dos tipos: sistema abierto y sistema cerrado, el sistema abierto tiene una incubadora y una cámara separadas entre sí, el sistema cerrado incluye la incubadora y la cámara, este sistemas está integrada a un microscopio que permite obtener imágenes en tiempo real sin alterar el medio ambiente como la temperatura y el CO₂ además de obtener imágenes y videos en vivo del desarrollo embrionario (Lundin y Hannah, 2020; Wong et al., 2013). Los embriones a través de una pantalla en tiempo real que pueden ser monitoreados desde la formación del cigoto, segmentación, mórula y blastocisto, manejados a través de un software (Lundin y Hannah, 2020; Meseguer et al., 2011) con la observación o monitoreo del desarrollo embrionario en cualquier momento (Wong et al., 2010).

Tabla 2*Clasificación de la calidad Embrionaria.*

Clasificación de embriones	
Embrión	Características
Excelente	Embriones con buena simetría, esféricas y una uniformidad en el tamaño, color y textura, con una irregularidad menor al 85% del material celular, una masa embrionaria intacta, la zona pelúcida debe ser delgada, lisa y sin superficies cóncavas o planas, son viables para la congelación y descongelación son denominados "embriones congelables" y recomendados para el comercio internacional.
Buena	Buen embrión, igual que la anterior con muy pocas irregularidades que pueden presentar en alguna de sus formas tamaño, color y textura. Con irregularidades menores al 50% en la masa embrionaria debe encontrarse intacta, estos embriones son buenos para realizar la transferencia embrionariaal instante no tienen la capacidad de soportar grandes cambios como la congelación se les denomina embriones transferibles, pero no congelables.
Regular	Embriones con grandes irregularidades en el tamaño, color, la masa celular del embrión debe estar intacta al menos al 25 %, son embriones que no son aptos para congelación/descongelación y las tasas de embarazo son muy bajas en comparación con embriones de excelente y buena calidad.
Mala	Embriones de mala calidad, muertos o degenerados, son embriones que por alguna razón no siguen su desarrollarse y deben desecharse. Intransferible. Embriones colapsados muy oscuros o embriones retardados.

Nota: Descripción de embriones para la selección según la calidad embrionaria

Fuente: Bo y Mapletoft. (2013).

CAPÍTULO IV

Materiales y Métodos

4.1. Ubicación geográfica

Las muestras (ovarios y testículos) fueron obtenidas del matadero municipal del distrito de Sicuani, provincia Canchis, que esta geográficamente ubicado a 3546 m.s.n.m., a $14^{\circ} 16'16$ latitud sur y a $71^{\circ} 13'44$ longitud oeste. Posteriormente fueron procesadas en el laboratorio de Embriología veterinaria (LABEMV) de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco ubicado en el distrito de Marangani a una altitud 3698 m.s.n.m., a $14^{\circ}21'23''$ de latitud Sur y a $71^{\circ}10'06''$ de longitud oeste (INEI, 2014; Figura 9)



Figura 9. Mapa de ubicación del Laboratorio de Embriología Veterinaria. EP Medicina Veterinaria UNSAAC.

Fuente: (Google, 2023)

4.2. Animales y muestra

Para el presente trabajo recolectamos un total de 224 ovarios de alpacas adultas y 7 testículos de alpacas machos mayor o igual a 3 años de edad. Todos los animales no tuvieron historial reproductivo ni tratamiento farmacológico previo.

4.3. Materiales de estudio

4.3.1. Materiales biológicos

- Ovarios de alpacas adultas
- Testículos de alpacas adultas

4.3.2. Materiales necesarios para el trabajo de campo

- Mameluco
- Dos termos de acero inoxidable (EUROHF CHEF[®] Germany)
- Botas de jebe
- Equipo de disección
- Solución de NaCl al 0.9%
- Guantes quirúrgica estériles
- Toallas de papel absorbente.
- Cuaderno de apuntes y lapicero
- Termómetro
- Penicilina

4.3.3. Materiales de laboratorio

- Mandil o guardapolvo
- Gorra quirúrgica
- Guantes quirúrgica
- Cubre boca
- Placas Petri de 90 mm x 15 mm
- Placas Petri de 35 mmx11 mm
- Tubos falcón de 15 mL
- Tubo falcón 50 mL
- Tubos eppendof de 0.5 mL
- Tubos eppendof de 1.5 mL
- Pipeta y puntillas de 1000 mL
- Pipeta y puntillas de 100 mL
- Pipeta y puntillas de 10 mL

- Vasos de precipitación de diferentes tamaños 100, 200, 500mL
- Láminas y laminillas cobre y porta objeto
- Jeringas de 1 mL, 5 mL, 10 mL y 20 mL
- Alcohol de 70°
- Gradillas de diferentes tamaños

4.3.4. Insumos para FIV

- Medio de lavado de ovocitos y embriones (Stroebech Media[®]).
- Medio maduración *in vitro* de ovocitos (Stroebech Media[®]).
- Medio de Fertilización *in vitro* (Stroebech Media[®]).
- Medio de SP-TALP SIGMA
- Medio de cultivo de embriones (Stroebech Media[®]).
- Aceite mineral de laboratorio.
- Agua mili Q.
- Alcohol de 70°
- Solución fisiológica (NaCl)
- Gas CO₂
- Agua destilada

4.3.5. Equipos del laboratorio

- Baño María
- Incubadora de CO₂
- Estereoscopio
- Microscopio invertido
- Platina térmica
- Mini Centrifuga
- Microscopio confocal
- Cabina de flujo laminar tipo vertical
- Vortex
- Espectrofotómetro con microcubetas
- Estufa
- Destilador de agua

- Refrigeradora

4.4. Metodología

4.4.1. Preparación de equipos, materiales y medios de cultivo para sistema convencional y continuo

Un día antes de uso, los equipos como las incubadoras (clásica y la incubadora de microscopio confocal) fueron encendidas y equilibradas, a una temperatura de 38.5 °C y al 5% del gas CO₂. Doce horas antes, el equipo de baño María fue atemperada a 37 °C, incorporando 3 vasos precipitados de 200 uL con cloruro de sodio (NaCl) al 0.9% con 100.000 UI/mL de penicilina y 100 mg/mL estreptomycin (solución de lavado de ovarios), posteriormente cubiertas con papel aluminio. Los medios, ya sea de maduración (MIV) de fertilización (FIV) y medio de cultivo *in vitro* (CIV), todos ellos de StroebechMedia ®; fueron preparadas dentro de la cabina del flujo laminar en una placa Petri de 35x11 mm formando 7 gotas de 50 uL, seguidamente cubiertas con aceite mineral estéril, cada placa Petri fue rotulada según el tipo de medio y el sistema de incubación (convencional y continuo) los mismos fueron equilibradas y estabilizadas en las incubadoras con 5% de CO₂ a 38.5 °C durante 12 horas.

4.4.2. Obtención y traslado de ovarios y testículos

Después del beneficio y evisceración de alpacas en el matadero, inmediatamente se ubicó y se obtuvo los ovarios con la ayuda de una tijera simple luego se colocó de 8 a 10 ovarios a un tubo Falcon® estéril de 50 mL tapado herméticamente y luego sumergido en un termo con agua atemperada a 37 °C. La obtención de testículos fue inmediatamente después del beneficio de la alpaca, utilizando una tijera simple, de animales adultos mayores o iguales a 3 años de edad (determinada por cronología dentaria) y, se transportó al laboratorio a temperatura ambiente (15 °C) en un recipiente isotérmico. El tiempo desde la obtención hasta la llegada a laboratorio, de ovarios y testículos fue de 2 a 3 horas.

4.4.3. Aspiración de COCs

En el laboratorio los ovarios fueron lavados 2 a 3 veces y colocados en un vaso precipitado con una solución de lavado de ovarios atemperado a 37 °C. Para la aspiración de COCs se tomó el ovario con una pinza diente de ratón, se sujetó con papel toalla estéril y se procedió a aspirar los folículos de 4 a 7 mm con una jeringa descartable de 10 mL adosado a una aguja de 21G x1 1/2'', conteniendo 0.2 mL de medio de lavado

de ovocito. El contenido se transfirió a un tubo Falcón® de 15 mL dentro del baño María.

4.4.4. Lavado y clasificación de COCs

El contenido aspirado se traspasó a una placa Petri de 90x35 mm colocado sobre una platina a 37 °C dentro de la cabina de flujo laminar. Luego se observó bajo un estereoscopio a 40 aumentos y con una micropipeta de 200 uL se retiró los COCs identificados, para luego trasladarlos a una serie de 3 a 4 gotas de 100 uL de medio de lavado de COCs. Los COCs fueron lavados por pipeteo suave en la serie de gotas y, clasificados de acuerdo al número de capas de células del cúmulus y la homogeneidad del citoplasma ovocitario (Landeo et al.,2022; Ratto et al., 2005), clasificando del siguiente modo:

- ❖ Grado I, COCs con más de tres capas de células del cúmulus y ovocito con citoplasma homogéneo;
- ❖ Grado II, COCs con 2 a 3 capas de células del cúmulus y ovocito con citoplasma homogéneo.
- ❖ Grado III, COCs con una capa de células del cúmulus y parcial o totalmente desnudos y, citoplasma de ovocito heterogéneo con presencia de vacuolas.
- ❖ Grado IV, COCs con células del cúmulus expandidos y ovocito con citoplasma muy irregular.

4.4.5. Maduración *in vitro* de COCs

Dentro de la cabina de flujo laminar a 37 °C observados bajo un estereoscopio a 40 aumentos; el total de COCs de grado I, II y III fueron considerados aptos para maduración, mientras que los de grado IV fueron descartados. Los COCs aptos fueron divididas aleatoriamente en dos grupos para su respectiva maduración en cada sistema de incubación (convencional y continuo). Para ambos sistemas; en la placa Petri con 7 gotas de 50 uL de medio de maduración preparadas y equilibradas anteriormente, a la primera gota, se ingresó todos los ovocitos aptos, desde donde se distribuyó al resto de las gotas (50 uL/gota del medio de maduración, llegando a un máximo de 10 COCs por cada gota). Finalmente se tuvo dos placas Petri listas para el periodo de maduración: una ingresó a la incubadora convencional y la otra al sistema continuo. El periodo de maduración para los COCs del sistema convencional y el sistema continuo fue de 26 horas (para que los ovocitos estén aptos para la fecundación).

Pasado las 26 horas. Las placas de MIV en el sistema continuo se observó directamente en el mismo equipo (microscopio confocal), sin la necesidad de retirar de la incubadora; mientras que en el sistema convencional se retiró de la incubadora para llevar a la cabina de flujo laminar a 37 °C y la evaluación de los COCs maduros se realizó bajo un estereoscopio. En ambos sistemas, la evaluación se determinó por la expansión de las células del cúmulus.

4.4.6. Lavado de espermatozoides

Los espermatozoides para la fecundación *in vitro* se obtuvieron de epidídimos muestreados en matadero. En el laboratorio, en un tubo Falcon® de 15 mL se preparó 5 mL de medio de lavado de espermatozoides SP-TALP (Sigma-Aldrich®), el mismo que fue atemperado 2 horas antes de su uso a 35 °C. La cola del epidídimo fue diseccionada del testículo con una tijera mayo y una pinza diente de ratón, sobre papel toalla estéril, hasta obtener epidídimo libre de restos de tejidos y sangre.

En la cabina del flujo laminar se colocó una placa Petri de 35x11mm sobre una platina temperada a 35 °C, dentro de ella se ingresó la cola del epidídimo obtenida, y se le adicionó 1 mL de medio de lavado de espermatozoides SP-TALP. Con ayuda de una tijera mayo y una pinza simple se trozó el epidídimo en varios trozos pequeños, a los que en seguida se oprimió con la pinza simple, con la finalidad de forzar la salida de los espermatozoides desde los túbulos y, finalmente obtener una solución de medio de lavado SP-TALP y espermatozoides.

Un mL de la última solución obtenida, se trasvasó a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó a 323 g x 5 minutos y al pellet obtenido se adicionó 1 mL de medio de lavado de espermatozoides SP-TALP y se sometió nuevamente a una segunda centrifugación a la misma velocidad y tiempo anterior desechando todo el sobrenadante, quedando solo el pellet al final se agregó 200 µL de medio FIV, no se adiciono ningún agente capacitante. Finalmente se calculó la concentración espermática con un equipo de fotómetro de esperma hasta alcanzar una concentración final de 1×10^6 espermatozoides/mL y una motilidad progresiva mayor a 60%, sin otras evaluaciones previas.

4.4.7. Fecundación *in vitro*

Previo a la inseminación, el medio de lavado de ovocito se atemperó 2 horas antes de culminar la maduración *in vitro* y, sobre una placa Petri se preparó una serie de 3 a 4 gotas de 100 uL de medio de lavado de ovocitos. Las placas de maduración se retiraron de las incubadoras (de sistema convencional y continua), se llevaron a la cabina de flujo laminar a 38.5 °C. Los COCs maduros (con células del cúmulus expandidas) fueron pipeteados suavemente en las mismas gotas de maduración con una micropipeta de 100 uL para aflojar las células del cúmulus. Los COCs maduros fueron transferidos y lavados con la ayuda de una micropipeta de 100 uL, a la serie de gotas antes preparadas, hasta obtener COCs libres de restos celulares aislados; estos COCs se llevaron a las placas de fertilización previamente preparadas con 7 gotas de 50 µL (FIV). A cada gota del mediodo FIV que contienen los ovocitos maduros se agregó una concentración de 1×10^6 espermatozoides/mL, luego cada placa de FIV retornó a las respectivas incubadoras (incubadora convencional y continua) incubándolos durante 24 horas.

4.4.8. Cultivo *in vitro* de cigotos

Veinticuatro horas después de FIV se retiraron las placas de ambos sistemas de incubación a la cabina del flujo laminar a una temperatura de 37 °C, sin control de CO₂, O₂ y bajo un estereoscopio se realizó varios pipeteos suaves para retirar espermatozoides y células de cúmulus en las mismas gotas. Luego con una micropipeta de 100 uL se retiraron los presuntos cigotos a una gota de medio de lavado de embriones (preparado y atemperado 2 horas antes) donde fueron lavadas hasta que queden libres de los espermatozoides y restos celulares. Los presuntos cigotos fueron distribuidos en las gotas de las placas de cultivo previamente preparadas (CIV), tanto en el sistema convencional como en el continuo, e incubadas por 7 días.

4.5. Evaluación del desarrollo embrionario *in vitro* por sistema convencional y por sistema continuo

La evaluación del desarrollo embrionario *in vitro* por el sistema convencional se realizó fuera de la incubadora en los 3 tiempos (48, 120 y 168 horas pos inseminación) utilizando una cabina de flujolaminar, una platina atemperada y un estereoscopio; terminada la evaluación la placa con embriones retornó a la incubadora para que continúe su desarrollo. Por el contrario, en el sistema continuo la evaluación se realizó directamente a través de un microscopio confocal incorporado a una cámara de incubación, no siendo necesario retirar de placa cultivo en los 3 momentos de evaluación.

La evaluación del desarrollo embrionario se realizó de acuerdo a lo descrito por Tanaka et al. (1997) y Picha et al. (2012). Considerando los estudios reportados por Picha et al. (2012) quienes realizaron un seguimiento del desarrollo embrionario *in vivo* reportando un desarrollo a las 48 horas pos copula embriones entre 2 a 4 células, a las 120 horas embriones que desarrollaron 100 % a mórulas y el día 7 pos copula encontró blastocistos, pero el día 8 encontró blastocistos eclosionados. Tanaka et al. (1997) realizó la evaluación de la siguiente manera:

1. Evaluación del desarrollo embrionario a las 48 horas (2 días) pos fecundación en el sistema convencional y continuo:
 - Embriones que desarrollaron > 4células o blastómeras.
 - Embriones que desarrollaron de 2 a 4 células o blastómeras.
2. Evaluación del desarrollo embrionario a las 120 horas (día 5) pos fecundación en el sistema convencional y continuo:
 - Mórulas (≥ 16 células).
 - Embriones de 8 células o blastómeras.
3. Evaluación de calidad de blastocisto a las 168 horas (día 7) pos fecundación. La calidad del blastocisto fue determinada de acuerdo a la clasificación de Bó y Mapletoft et al. (2013) y Pérez et al., (2017).
 - **Excelente:** Embriones con buena simetría, esféricas y una uniformidad en el tamaño, color y textura, con una irregularidad menor al 85% del material celular, una masa embrionaria intacta. Zona pelúcida delgada, lisa y sin superficies cóncavas o planas.
 - **Buena:** Igual que la anterior con muy pocas irregularidades que pueden presentar en alguna de sus formas tamaño, color y textura. Con irregularidades menores al 50% en la masa embrionaria.
 - **Regular:** Embriones con grandes irregularidades en el tamaño, color, densidad. La masa celular del embrión intacta al menos al 25 %.
 - **Mala:** Muertos o degenerados que por alguna razón no llegaron a culminar su desarrollo.

4.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la evaluación de desarrollo embrionario en los tres momentos y en ambos sistemas (convencional, continuo) fueron almacenados y ordenados en una base de datos de Microsoft Excel. Luego estos se sometieron a la prueba estadística no paramétrica de Kruskal Wallis. El análisis se determinó usando el programa Number Crunching Statistical System (NCSS) 2022, v22.0.5. Con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

CAPÍTULO V

Resultados y Discusión

Se usó 224 ovarios y se recuperó 1084 ovocitos de calidad I, II y III. Los ovocitos se dividieron aleatoriamente en 542 para sistema de incubación convencional y 542 para sistema de incubación continuo. Los ovocitos maduros fueron 203 (37.45%) y 331 (61.07%) para sistema convencional y sistema continuo, respectivamente. El número de ovocitos fertilizados fue 185 de los cuales 73 fueron por cultivo convencional y 112 por cultivo continuo.

5.1. Desarrollo embrionario *in vitro* a las 48 horas pos fecundación

Los resultados de la evaluación del desarrollo embrionario a las 48 horas pos fecundación se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3

Desarrollo embrionario in vitro de alpacas a las 48 horas pos fecundación según sistemas de incubación convencional y continuo

Sistema	COCs Maduros n	2 -4 células		> 4 células		Total	
		n	%	n	%	n	%
Convencional	203	55/203	27.09 ^a	18/203	8.87 ^a	73/203	35.96 ^a
Continuo	331	86/331	25.98 ^a	26/331	7.85 ^a	112/331	33.84 ^a

Nota: Los datos porcentuales de obtuvieron en relación a los COCs maduros de cada sistema de producción embrionario *in vitro*. Letras diferentes (a) en la misma columna indican diferencia estadística, ($p > 0.05$).

El desarrollo embrionario temprano a las 48 horas pos fecundación fue similar ($p > 0.05$) para los sistemas convencional y continuo. No se encontraron referencias bibliográficas para el sistema continuo en alpacas por lo que constituye el primer reporte a este respecto. Sin embargo, si existen referencias para los dos sistemas de incubación en vacunos (Huayhua et al., 2023) y humanos (Kahraman et al., 2013; Ahlström et al., 2022). Los resultados del presente trabajo son similares a los reportado en vacunos. Esta similitud se podría deber a varios factores, como la procedencia de los ovarios, la temperatura, el nivel de CO₂ (Sjoblom y Liperis, 2019), el pH (Lane et al., 1998). La tasa de segmentación fue diferente y superior a los resultados del presente trabajo (sistema convencional 35.96% y

sistema continuo 33.85%) que de vacunos (sistema convencional 82.1% y sistema continuo 83.7%). Esta diferencia se podría deber al tiempo de evaluación (48, 72 horas). Los cigotos que retardaron su división celular, tienen defectos cromosómicos y no llegan a completar su desarrollo (Van Blerkom et al., 2019). Por otro lado, se puede mencionar la falta de estandarización de protocolos de fertilización *in vitro* en alpacas (Ruiz, 2002). En vacunos, la manipulación de embriones está avanzada y con buenos resultados en transferencia embrionaria (Fernández et al., 2007; Gordon, 2003).

En referencia a los reportes en humanos, tampoco existen diferencias con el presente trabajo (Kahraman et al., 2013; Ahlström et al., 2022). Esta ausencia de diferencias se podría deber a la falta del cambio de medio de cultivo (Or et al., 2019). La exposición de embriones al medio ambiente del entorno de FIV puede ser otra causa de falta de diferencia (Cohen et al., 2019). El enfriamiento de la placa de cultivo de embriones perjudica el desarrollo embrionario (Sjoblom y Liperis, 2019). La tasa de segmentación del presente trabajo fue 35.96 y 33.84% inferior a (Kahraman et al., 2013) a 91.38% se sistema convencional 82.28% por sistema continuo y (Ahlström et al., 2022) de 60.1% sistema convencional y 61.5% sistema continuo, respectivamente. Diferencias que podrían atribuirse a la técnica de obtención de ovocitos mediante la administración de hormonas, estimulación ovárica (Or et al., 2019). Las muestras en humanos proceden de la aspiración de ovocitos mediante la técnica OPU. Otra explicación sería el estrés ambiental que sufrieron durante la manipulación de COCs e inseminación *in vitro* (Lane et al., 1998; Cohen et al. 2019; Doherty et al., 2000) y la corriente de aire en el laboratorio que son fuente de agentes contaminantes y tóxicos para el embrión (Guns y Janssens, 2019). Lo que también ocurre en humanos, pero en tiempos breves según el tipo de sistema de incubación (Cohen et al., 2019).

En cuanto a los CSA se encontraron reportes de embriones obtenidos por sistema convencional con tasa de segmentación o clivaje que incluyen el total de cigotos escindidos entre 2, 4 y 8 células. El resultado del presente trabajo (35.96%) por método convencional fueron similares a Ruiz y Artica. (2021), con 35.6%, esta similitud se podría explicar por la condición que fue equilibrada el equipo de incubadora de CO₂. Sin embargo, supera a los resultados de Pérez et al. (2017), 27.5%, Huanca et al. (2014), 19.8%, Palomino et al. (2020), 16.53%, Gandarillas et al. (2022), 3.5% esta diferencia se atribuye al tiempo de transporte de ovarios al laboratorio, el tiempo de maduración que es esencial para la fecundación de estos ovocitos (Huanca et al., 2014; Huanca et al.,

2009; Ruiz y Artica 2021), y la concentración de espermatozoides con que fueron inseminadas Pérez et al. (2017). Pero inferior al trabajo reportado por Landeo et al. (2022), con 55.4%, esta diferencia se podría atribuir al cambio del medio de cultivo cada cierto tiempo (Ciray et al., 2012) y la calidad del semen utilizado en el procedimiento (Arriaga et al., 2014; Apichela et al., 2015) el uso de suplementos en los medios de MIV, FIV y CIV y, además, en alpacas aún no están estandarizadas los protocolos de FIV (Ruiz, 2022).

5.2. Desarrollo embrionario *in vitro* a las 120 horas pos fecundación

En la Tabla 4, se describe detalladamente la diferencia de la tasa de desarrollo de embriones en estado de mórula y de 8 blastómeras a los 5 días después de la fecundación *in vitro*, tanto en el sistema convencional como en el sistema continuo.

Tabla 4

Desarrollo embrionario in vitro de alpacas a las 120 horas pos fecundación según el sistema de incubación convencional y continuo.

Sistema	Segmentados	8 células		Mórula		total	
	n	n	%	n	%	n	%
Convencional	73	16/73	21.92 ^a	33/73	45.2 ^a	49/73	67.12 ^a
Continuo	112	26/112	23.21 ^a	44/112	39.29 ^a	70/112	62.5 ^a

Nota: Diferencia entre la producción de mórulas y embriones de 8 células. Letras diferentes (a) en la misma columna indican diferencia estadística ($p > 0.05$).

La tasa de desarrollo embrionario de 8 células y mórula ambos sistemas de incubación fueron similares ($p > 0.05$) sin ninguna diferencia, sin embargo, los estudios realizados en humanos fueron diferentes al presente trabajo Barberet et al. (2018). Esta diferencia se explicaría por la calidad de COCs y la maduración de COCs (Cohen et al., 2019) y la osmolaridad (Sjoblom y Liperis, 2019). La tasa de desarrollo embrionario de 8 células del presente trabajo (21.92%, 23.21%) es inferior a 26.6% 8 células sistema convencional y 26.7% 8 células sistema continuo. El desarrollo embrionario a mórula es inferior el presente trabajo (45.2% y 39.29%) con 1.9% mórulas sistema convencional y 3.6% mórulas por sistema continuo (Barberet et al., 2018). Diferencia que se explica por el tiempo de evaluación (día 5, día 3) y el estudio constante que permitió estandarizar protocolos de FIV en comparación con alpacas (Kovacs, 2014) y así como a la división asincrónica de los blastómeras (Palma., 2008; Gilbert, 2000; Barbeito et al., 2020). Un 100% de desarrollo embrionario (Picha et al., 2021) que es superior a los resultados del

presente trabajo. El mencionado evaluó a los 5 días pos ovulación. El presente trabajo se tomó en cuenta el día de fecundación *in vitro* y Picha et al. (2021), fue por empadre de alpacas. En el presente estudio los embriones se encuentran en medio de cultivo artificial y en el caso de Picha et al., (2021), en medio natural (oviducto). Esta diferencia indica que se necesita mejorar los componentes del medio de cultivo. Sin embargo, Kahraman et al. (2013) no encontró diferencias entre sistemas convencional y continuo y la tasa del desarrollo embrionario son similares al presente trabajo con 43,77% de mórulas por sistema convencional y 39,78% de mórulas por sistema continuo esta similitud sería por razones del medio de cultivo continuo sin cambios durante el desarrollo embrionario *in vitro* (Or et al., 2019; Pérez et al., 2018) y la preparación y equilibrio de equipos de incubación (Cohen et al., 2019).

Los reportes en CSA por sistema convencional de la tabla 4 con resultado de 45.20% de mórulas fue mayor a 17.4% reportado por Pérez et al. (2018) diferencia que sería explicada por el tiempo que fueron expuestos los embriones fuera de la incubadora. Los embriones son muy sensibles a los cambios de aire (Rocha et al., 2016) de la primera evaluación, y menor a 89.0% reportado por Landeo et al. (2022), estas diferencias se podrían atribuir a los diferentes medios utilizados (Ruiz, 2022) como el medio de cultivo de embriones que interviene en el desarrollo de embriones a la fase de mórula (tasa de mórulas; Manrique y Taype, 2017). Pero similar a 46.2% y 42.5% al reporte de Berland et al. (2011); podría influir la preparación de 12 horas antes los medios de cultivo y el manejo del laboratorio (Cohen et al., 2019). La evaluación de mórulas no es frecuente debido a la fase crítica por la compactación, que requiere un control estricto como la temperatura y pH, para la formación del blastocelo (Gardner y Balaban, 2016). En el presente trabajo se observó en gran cantidad mórulas frente a embriones de 8 células, esta razón podría ser explicada por Picha et al. (2021), quienes reportaron una tasa de 100% de desarrollo embrionario *in vivo* a estado de mórula a los 5 días pos ovulación. Se puede decir que el día adecuado para evaluar el desarrollo a mórula es el día 5 pero esto podría variar de acuerdo al medio de cultivo que se utiliza y a la especie (Pérez et al., 2018).

5.3. Desarrollo embrionario *in vitro* de alpacas a las 168 horas pos fecundación

El desarrollo embrionario a los 7 días pos fecundación se encuentran en blastocisto. En esta etapa la evaluación se realizó de acuerdo a la estructura morfológica que determina la calidad de embriones, fueron clasificados en 4 categorías: excelente, bueno, regular y

malo (Tabla 5).

Tabla 5

Desarrollo embrionario in vitro de alpacas a las 168 horas pos fecundación según sistema de incubación convencional y continuo.

Sistema	Mórula y embrión de 8 células	Embriones de alta calidad					Embriones de mala calidad					Total
		Excelente		Bueno		Total	Regular		Malo		Total	
		n	%	n	%	n (%)	n	%	n	%	n (%)	
Convencional	49	17/49	34.7 ^a	10/49	20.4 ^a	27 (55.1)	4/49	8.2 ^a	1/49	2	5 (10.2)	32 (65.3)
Continuo	70	18/70	25.7 ^a	13/70	18.6 ^a	31 (44.3)	6/70	8.6 ^a	4/70	5.7	10 (14.3)	41 (58.6)

Nota: Letras diferentes (a) en la misma columna indican diferencia estadística ($p > 0.05$).

El presente trabajo con resultados comparativos de calidad embrionaria entre los sistemas convencional y continuo (Tabla 5), a los 7 días después de la fecundación *in vitro*, fueron similares ($p > 0.05$). En CSA no se encontraron resultados de trabajos evaluando la calidad embrionaria por sistema continuo y por sistema convencional, pero en humanos y vacunos se encontraron trabajos realizados en ambos sistemas con resultados diferentes y similares. En vacunos se encontró una diferencia concluyendo que el mejor sistema de obtención de embriones es por sistema continuo la diferencia de estos resultados podría ser por el cambio de medio de cultivo durante su desarrollo temprano de embriones (el embrión durante el viaje del oviducto al útero sufren varios cambios), los embriones consumen y generan desechos que podrían perjudicar su desarrollo (Or et al., 2019) pero en la tasa de blastocisto de la tabla 5 del sistema convencional y continuo (65.3% y 58.6%) es superior frente a la tasa de blastocisto obtenidas en vacunos (30.7% y 42,8%) por Huayhua et al. (2023) con embriones viables de 39,58% y no viables 60.42% por sistema continuo superando el presente trabajo (44.3%) de embriones viables, esta diferencia se debería al cambio del medio de cultivo durante el desarrollo embrionario en vacunos (Wale y Gardner, 2016; Huayhua et al. 2023) debido a que los embriones son sensibles a cambios bruscos del ambiente (Wale y Gardner, 2016).

En la evaluación de embriones viables de humanos por Kahraman et al. (2013); Chera-aree et al. (2021) y Kirkegaard et al. (2012), no encontraron diferencias en ambos sistemas (convencional y continuo), concuerdan con el presente trabajo, pero son inferiores a la tasa de embriones viables frente a 64,31% convencional y 66,67% de Kahraman et al.

(2013) y 69% y 73% de Chera-aree et al. (2021). Esta diferencia sería por razones de manejo del laboratorio, tipo o tamaño de las incubadoras debido a que son responsables en regular el medio ambiente según el tipo de sistema de incubación (Swain, 2014; Meintjes, 2019), las instalaciones y la corriente de aire dentro del laboratorio (Boone, 1999), la exposición de luz por periodos largos (los embriones que son expuestos a la luz por periodos largos son afectados en su desarrollo; Sjoblom y Liseris, 2019). Por otro lado, la Tabla 5 de la tasa embriones viables son superiores al trabajo de Kirkegaard et al. (2012), 24,9 % (continuo); 23,2 % (convencional), estas variaciones con respecto a otros trabajos podrían atribuirse a las diferencias en el manejo ambiental, la velocidad del operador de gametos y embriones, los cambios de temperatura en el momentos del cambio de los medios de cultivo y evaluaciones del desarrollo embrionario (Pollet-Villard y Levy, 2018), por los medios utilizados desde la segmentación hasta el desarrollo de blastocisto (Van Soom et al., 2002) posteriormente afectando la implantación (Nget al., 2000).

Por el sistema convencional se encontraron reportes en la evaluación y clasificación según la calidad del embrión; así Contreras et al. (2014) reportaron 5.3% de blastocisto de excelente calidad, 9.53% de buena calidad, 3.02% de regular calidad y 1.16% de mala calidad; en otro trabajo Laineset al. (2021) obtuvieron 8.49% de blastocistos de excelente calidad, 5.87% de buena calidad, 6.82% de regular calidad y 9.16% de mala calidad, ambos estudios muestran resultados inferiores al presente trabajo (Tabla 5). Por otro lado, Palomino et al.(2020) reporta resultados superiores, obteniendo 56.9% de embriones de excelente calidad, 31.4% de buena calidad, 9.8% de regular calidad y 2.0% de mala calidad. Esta diferencia podría ser por razones de periodos de tiempo en que los embriones son manipulados fuera de la incubadora, la variación en la temperatura, el pH del medio y la humedad, lo que afectaría negativamente a los gametos y la calidad embrionaria (Chansel et al., 2023; Mahdavinezhad et al., 2019). Además, cuantos más se expongan al estrés en el laboratorio pueden resultar en sinergias negativas, que culminarían en un trauma significativo para el embrión en desarrollo (Awonuga et al., 2013; Mahdavinezhad et al., 2019). La calidad como las tasas de blastocisto obtenidas *in vivo* son superiores a las obtenidas *in vitro*, así Pacheco et al. (2016) obtuvo 57.2% de embriones de excelente calidad, 23.8% de buena calidad, 19.0% de regular calidad y 0 % de mala calidad; pues el desarrollo del embrión fuera del cuerpo significa que está constantemente expuesto a tensiones que no experimentaría *in vivo*, la exposición del oxígeno atmosférico (20%) y la acumulación de toxinas en los medios debido a la naturaleza estática del cultivo (Wale y Gardner, 2016).

CAPÍTULO VI

Conclusiones

- El desarrollo embrionario a las 48 pos fecundación bajo un sistema convencional y sistema continuo son similares.
- La evaluación del desarrollo embrionario a las 120 horas pos fecundación por sistema convencional y sistema continuo no son diferentes.
- No existe diferencia a las 168 horas pos fecundación por sistema convencional y sistema continuo.

Recomendaciones

- Realizar un seguimiento del desarrollo embrionario *in vitro* de los cigotos con escisión temprana y tardía hasta el estadio de blastocisto.
- Realizar un estudio comparativo del desarrollo embrionario *in vitro* con medio de cultivo embrionario de cambio obligatorio y medio de un solo paso.
- Estudiar las tasas de implantación embrionaria pos transferencias embrionarias con embriones obtenidos de sistema continuo y convencional.

CAPITULO VII

Referencias

- Ahlström A., Lundin K., Lind A., Gunnarsson K., Westlander G., Park H., Thurin-Kjellberg A., Thorsteinsdottir S., Einarsson S., Åström M., Löfdahl K., Menezes J., Callender S., Nyberg C., Winerdal J., Stenfelt C., Jonassen B., Oldereid N., Nolte L., Sundler M., Hardarson T. (2022), A double-blind randomized controlled trial investigating a time-lapse algorithm for selecting Day 5 blastocysts for transfer, *Human Reproduction*, Volumen 37, Número 4, Abril de, páginas 708–717, <https://doi.org/10.1093/humrep/deac020>.
- Apichela, S.A., Argañaraz M.E., Zampini R., Vencato J., Miceli D.C., Stelletta C., (2015). Biochemical composition and protein profile of alpaca (*Vicugna pacos*) oviductal fluid. *Animal Reproduction Science*. Volume 154, Pages 79-85. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.12.013
- Armstrong, S., Bhide, P., Jordan, V., Pacey, A. y Farquhar, C. (2018). Time-lapse Systems for Embryo Incubation and Assessment in Assisted Reproduction (Review). *Cochrane Library*. doi:DOI: 10.1002/14651858.CD011320.pub3.
- 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 Ovocitos realizada en Huancavelica-Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 477-486. doi:<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10783>
- Awonuga AO, Yang Y, Rappolee DA. (2013). When stresses collide. *Biol Reprod* 89:74. 71 –72.
- Bagnarella F. (2015). Fertilización *in vitro*. Costa Rica. *Revista Parlamentaria*. Vol. 21Pág. 205-247.
- Barbeito M., Alvarado F., Zuccolill G. Las primeras etapas del desarrollo ontogénico de

los Mamíferos. Capítulo 2 de Zuccolill G. (2020) Embriología sistemática y Desarrollo temprano de los sistemas y los aparatos de los mamíferos domésticos. Editorial de la UNLP, Universidad Nacional de la Plata Libro de cátedra. Buenos Aires-Argentina. Pág. 36-46.

Barberet J., Chammas J., Bruno C., Valot E., Vuillemin C., Jonval L., Choux C., Sagot P., Soudry A., Fauque P. (2018). Randomized controlled trial comparing embryo culture in two incubator systems: G185 K-System versus EmbryoScope. *Fertil Steril.* Feb;109(2):302-309.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.10.008. Epub 2017 Nov 23. PMID: 29175066.

Berland M., Baer A, Ruiz J., Parraguez VH., Morales P., Adams GP., Ratto MH. (2011). In vitro fertilization and development of cumulus oocytes complexes collected by ultrasound-guided follicle aspiration in superstimulated llamas. *Theriogenology.* May;75(8):1482-8. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.047. Epub 2011 Feb 4. PMID: 21295835.

Bertoldo A., Holyoake B., Evans A. y Grupen A. (2010) Oocyte developmental competence is reduced in sows during the seasonal infertility period. *Reproduction, Fertility and Development*, CSIRO publishing. Pág. 1222–1229. Doi: 10.1071/RD10093.

Biggers JD. (1998) Reflections on the culture of the preimplantation embryo. *Int J Dev Biol.*;42(7):879-84. PMID: 9853817.

Biggers JD, Summers MC. (2008). Choosing a culture medium: making informed choices. *Fertil Steril.* Sep;90(3):473-83. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.08.010. PMID: 18847602.

Bó, G., Mapletoft R. (2013). Evaluation and Classification of Bovine Embryos. *Anim. Reprod.* Vol. 10. Pág. 344-348.

Boeta, M., Balcazar A., Cerbon J., Hernandez J., Hernandez J., Paramo R., Zarco L. (2018). *Fisiología Reproductiva Animales Domestificación*. México: Universidad Nacional Autónoma de México, pág. 159-180.

- Bonilla F., Dolz M., Moreno J, Raga F. (2009), Reproducción Asistida Abordaje en la práctica clínica Ed. Médica Panamericana, Madrid, Pág. 364.
- Boone WR., Johnson JE., Locke AJ., Crane MM 4th, Price TM. (1999). Control of air quality in an assisted reproductive technology laboratory. *Fertil Steril*. 1999 Jan;71(1):150-4. doi: 10.1016/s0015-0282(98)00395-1. PMID: 9935133.
- Brown B., (2000). A review on Reproduction in South American Elsevier, *Animal Reproduction Science* 58. Pág. 169–19.
- Chansel L., Carles M., Moreau J., Depuydt C., Gallo S., Genvrin E., Léandri R., Gatimel N. (2023). How and when to measure pH in IVF culture media: validation of a portable blood gas analyzer in two IVF culture dishes for time lapse and conventional incubators. *J Assist Reprod Genet*. 2023 Jul;40(7):1677-1687. doi: 10.1007/s10815-023-02828-6. Epub, Jun 14. PMID: 37314570; PMCID: PMC10352227.
- Chen M., Wu Y., Huang X., Li W., Sun C., Meng Z., Ai A., Hong L., Tang C., Li K., Fu Y., Chen Z., Kong P., Guo Y., Liu W., Mol BW., Teng X. (2020). Embryo incubation by time-lapse systems versus conventional incubators in Chinese women with diminished ovarian reserve undergoing IVF/ICSI: a study protocol for a randomised controlled trial. *BMJ Open*. Nov 14;10(11):e038657. doi: 10.1136/bmjopen-2020-038657.
- Chera-Aree P., Thanaboonyawat I., Thokha B., Laokirkkiat P. (2021) Comparison of pregnancy outcomes using a time-lapse monitoring system for embryo incubation versus a conventional incubator in *in vitro* fertilization: An age-stratification analysis. *Clin Exp Reprod Med*. 2021 Jun;48(2):174-183. doi: 10.5653/cepm.2020.04091. Epub 2021 May 18. PMID: 34024081; PMCID: PMC8176153.
- Climont, S., Sarasa, M., Dominguez, L., Muniesa, P. y Terrado, J. (2000). *Manual de Anatomía y Embriología de los Animales Domésticos conceptos básicos y datos aplicativos*. España: Acribia, S.A, Pág. 7-57.
- Ciray HN., Aksoy T., Goktas C., Ozturk B., Bahceci M. (2012). Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media--a sibling

oocyte study. *J Assist Reprod Genet.* Sep;29(9):891-900. doi: 10.1007/s10815-012-9818-7. Epub 2012 Jun 20. PMID: 22714134; PMCID: PMC3463674.

Cívico Y., Hernández B., Cívico S. (2022). Selección de embriones en los tratamientos de fecundación *in vitro*. Unidad de Reproducción Humana Asistida, Servicio de Ginecología, Institut Clínic de Ginecología, Obstetricia i Neonatologia (ICGON), Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, España. Vol. 49. Núm. 1. DOI: 10.1016/j.gine.2021.100709.

Cohen J., Alikani M., Gilligan A., Schimmel T. Capítulo 2 Montaje de una unidad ART: Planificación, Diseño y Construcción de Peter N., Varghese A., Agarwal A. *Fertilización in vitro* (2019), 2da Edición, Editorial Springer, Pág. 9-18. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-43011-9>

Contreras, M., Olaguivel, C., Naveros, M. (2014). Evaluación de la Calidad de Embriones Producidos por Fertilización *in vitro* en Alpacas (*Vicugna pacos*). *Asociación Peruana de Producción Animal*. XXXVII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Pág.248- 251.

Contreras M., Naveros M., Olaguivel C., (2021), Efecto del uso de dos técnicas de selección espermática en la producción *in vitro* de embriones de alpaca, *Spermova* 11(1), Pág. 67 – 72, DOI. 10.18548/aspe/0009.10

Desai, N., Goldberg J., Falcone C. A. (2018). Are Cleavage Anomalies, Multinucleation, or Specific Cell Cycle Kinetics Observed with Time-Lapse Imaging Predictive of Embryo Developmental Capacity or Ploidy?. *Fertility and Sterility*, 1- 10. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.12.025.

Desai, N., Ploskonka, S., Goodman, L., Austin, C., Falcone J. G. (2014). Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12-54. doi:<https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-54>.

Doherty AS., Mann MR., Tremblay KD., Bartolomei MS., Schultz RM. (2000). Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation

mouse embryo. Biol Reprod. Jun;62(6):1526-35. doi: 10.1095/biolreprod62.6.1526. PMID: 10819752.

Fernández A., Díaz T., Muñoz G. (2007). Producción *In vitro* de Embriones Bovinos *In vitro* Production of Bovine Embryos, Rev. Fac. Cs. Vets Reproducción Animal. UCV. 48(1): 51-60.

Fowler, M., Bravo W. (2010). Medicine and Surgery of Camelids, Wiley-Blackwell, USA. Pág 3-4.

Fryc K., Nowak A., Kij B., Kochan J., Bartlewski P., Murawski M. (2021). Timing of cleavage divisions determined with time-lapse imaging is linked to blastocyst formation rates and quality of *in vitro*-produced ovine embryos. Theriogenology, Vol. 159, Pág.147-152. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.03>.

Gamarra G., Huamán E., León S., Carpio M., Alvarado E., Asparrin M., Vivanco W. (2008), First *in vitro* embryo production in alpacas (*Lamas pacos*). Reproduction Fertility and Development 21 (1): 177-178

Gandarillas D., Quispe A. (2021). Manual Técnico: Terminología en Biotecnología Reproductiva Animal, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann Av. Miraflores S/N Tacna, Perú Pág. 1-53.

Gandarillas D., Rios R., Quispe A., Torres E., Puma A. (2022). Evaluación de Cuatro Tiempos de Maduración *In Vitro* en Ovocitos de Alpacas sobre la Tasa de Maduración y Desarrollo Embrionario. Spermova 12(1). Pág. 8-13. DOI. 10.18548/aspe/0010.02.

García J., Gil F. (2013). Embriología Veterinaria Un Enfoque Dinámico del Desarrollo Animal. Inter-médica, Argentina, Pág. 9-21.

Gardner DK., Lane M. (2002). Development of viable mammalian embryos in vitro: evolution from sequential media. In: Cibelli J, Lanza RP, KHS C, West MD, editors. Principles of Cloning. New York: Academic Press. p. 187–213. https://www.researchgate.net/publication/289987754_Development_of_Viable_Mammalian_Embryos_In_VitroEvolution_of_Sequential_Media.

- Gardner D., Balaban B. (2016). Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and OMICS: is looking good still important?. *Molecular human reproduction*. Vol. 22, Pág.704-718. doi:10.1093/molehr/gaw057.
- Geisert y Malayer (2002). Inducción de Ovulación, Producción de Transferencia de embriones. Capítulo 29. En Hafez, E., Hafez, B. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. McGraw-Hill Interamericana. México. Pág. 427.
- Gilbert S. (2000). *Developmental Biology*. 6ta Edición. Editorial Medica Panamericana. Madrid-España. Pág.
- Giuliano S., Trasorras V. (2011). Producción *in vitro* de Embriones de Camélidos Sudamericanos. *Spermova* 1(1):Pág. 60-61.
- Gordon, I. (2003). *Laboratory Production of Cattle Embryos* (2da ed.). USA: CAB International, 2da Edición, Pág. 176-321.
- González H., González H. M., (2005). Biotecnología Reproductiva: Una alternativa para la producción animal. *Biotempo*. Vol. 5. Pág. 6-12.
- Guo Yu-han, Liu Yan, Qi Lin, Song Wen-yan, Jin Hai-xia. (2022) Can Time-Lapse Incubation and Monitoring Be Beneficial to Assisted Reproduction Technology Outcomes? A Randomized Controlled Trial Using Day 3 Double Embryo Transfer. *Frontiers in Physiology*. 12. DOI: 10.3389/fphys.2021.794601
- Guillen, C. (2018). Efecto de factores de crecimiento sobre la tasa de maduración de ovocitos y desarrollo embrionario In vitro de alpaca. *Tesis para Obtener el Título Profesional de Biología en la Especialidad de Biotecnología*, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Pág. 1-111.
- Guns J., Janssens r. Capítulo 4 Gestión de la calidad del aire de Peter N., Varghese A., Agarwal A. *Fertilización in vitro* (2019), 2da Edición, Editorial Springer, Pág. 29-37. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-43011-9>
- Hafez, E., Hafez, B. (2002). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. México:McGraw-Hill Interamericana, parte II, Pág. 70-113.

- Held E., Mertens E., Mohammadi A., Salilew D., Besenfelder U., Havlicek V. y Hölker K. S. (21 de April de 2012), Zona Pellucida Birefringence Correlates With Developmental Capacity of Bovine Oocytes Classified by Maturational Environment, COC Morphology and G6PDH Activity. *Reproduction, Fertility and Development*. Pag. 568-579. doi:<https://doi.org/10.1071/RD11112>.
- Herradon P., Quintela L., Becerra J., Ruibal S. y Fernandez M. (2007), Fecundación *in vitro*: Alternativa para la Mejora Genética en Bovinos. *Arch. Latinoam. Prod. Anim. Vol.15*. 34-41.
- Hoshi H. (2003). In vitro Production of Bovine Embryos and their Application for Embryo Transfer. *Theriogenology, Volumen 59*, 675-685. doi:[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01247-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01247-5).
- Huanca W., Condori R., Chileno M., García P., Cainzo J., Becerra J. (2014). Effect of Time of Incubation on Nuclear Maturation and Cleavage Post *In vitro* Fertilization of Alpaca Oocytes. *Rev Inv Vet*. 25(4), Pág. 468-476.
- Huanca W., Palomino J., Cervantes M., Cordero M., Huanca A. (2007), Effecto of Transpot Temperatures (35°C, 4°C) on The Morphologic Quality of Oocytes Collected from Ovaries of Alpaca. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1-3.
- Huanca T., (2022). Recuperación de Embriones en Hembras de Alpacas y Llamas Con Ovulación Única o Múltiple. RIA Vol. 48 n.º 1 abril, Argentina. Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Programa Nacional de Innovación en Camélidos, Puno, Perú, Pág.48-52.
- Huayhua C, Rodríguez M, Vega J, Briones M, Rodríguez-Alvarez L, Mellisho E. (2023), Blastulation time measured with time-lapse system can predict *in vitro* viability of bovine blastocysts. *PLoS One*. Aug 10;18(8):e0289751. doi: 10.1371/journal.pone.0289751. PMID: 37561791; PMCID: PMC10414680.
- INEI - Instituto Nacional de Estadística e Informática (2014). Departamento Cusco: Población total y ubicación geográfica de la capital legal, según provincias y distritos.
- Kahraman S, Çetinkaya M, Pirkevi C, Yelke H, Kumtepe Y. (2013) Comparison of

Blastocyst Development and Cycle Outcome in Patients with eSET Using Either Conventional or Time Lapse Incubators. A Prospective Study of Good Prognosis Patients. *Journal of Reproductive and Stem Cell Biotechnology*. 2012;3(2):55-61.doi:10.1177/205891581200300204.

Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Grøndahl ML, Kesmodel US, Ingerslev HJ. A (2012), Randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *J Assist Reprod Genet*. Jun;29(6):565-72. doi: 10.1007/s10815-012-9750-x. Epub 2012 Mar 30. PMID: 22460082; PMCID: PMC3370049.

Khatir, H., Anouassi, A., Tibary, A. (2005), *In Vitro* And *In Vivo* Developmental Competence of Dromedary (*Camelus Dromedarius*) Embryos Produced *In Vitro* Using Two Culture Systems (mkSOMaa and Oviductal Cells). *Reprod Dom Anim* 40,245-249.

Kovacs, P. (2014), Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reprod Biol Endocrinol* 12, 124–124. doi:DOI: 10.1186 / 1477-7827-12-124.

Lane M, Gardner DK. (1998), Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Hum Reprod*. Apr;13(4):991-7. doi: 10.1093/humrep/13.4.991. PMID: 9619560.

Landeo L., Zuñiga M., Gastelu T., Artica M., Ruiz J., Silva M., Ratto M., (2022), Oocyte Quality, *In Vitro* Fertilization and Embryo Development of Alpaca Oocytes Collected by Ultrasound-Guided Follicular Aspiration or from Slaughterhouse Ovaries, *Animals*, *Pag.* 22-1102, <https://doi.org/10.3390/ani12091102>.

Laines I., Contreras M., Olaguivel C., (2021), Evaluation of Two Culture Media *In Vitro* Production of Alpaca, *Spermova* 11(1). Pág. 46-52 DOI. 10.18548/aspe/0009.07.

Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. (2008), Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online*. Sep;17(3):385-91. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60222-2. PMID: 18765009.

López, P., Galina, C., Merchant, H., Cedilo, C. y Aspron, M. (19 de February de 2008),

Assessment of Bos taurus Embryos Comparing Stereoscopic Microscopy and Transmission Electron Microscopy. *ResearchGate*, 72-78.
doi:<https://www.researchgate.net/publication/200672742>.

Lorenzo, P. (1992), Maduración *in vitro* de Oocitos de Ganado Vacuno. Tesis Doctoral *Universidad Complutense de Madrid*, Pág. 1-245.

Lundin K., Hannah P. (2020), Time-lapse technology for embryo culture and selectio. Taylor & Francis Group. *Upsala Journal of Medical Sciences* Vol. 125, NO. 2, 77–84. Doi: <https://doi.org/10.1080/03009734.2020.1728444>.

Magata F. (2023), Time-lapse monitoring technologies for the selection of bovine *in vitro* fertilized embryos with high implantation potential. *J Reprod Dev.* Apr 3;69(2):57-64. doi: 10.1262/jrd.2022-131. Epub 2023 Feb 12. PMID: 36775299; PMCID: PMC10085772.

Mahdavinezhad F, Kazemi P, Fathalizadeh P, Sarmadi F, Sotoodeh L, Hashemi E, Hajarian H, Dashtizad M. (2019), *In vitro* versus *In vivo*: Development-, Apoptosis-, and Implantation- Related Gene Expression in Mouse Blastocyst. *Iran J Biotechnol.* Jan 11;17(1):e2157. doi: 10.21859/ijb.2157. PMID: 31457046; PMCID: PMC6697851.

Manrique L., Taype E. (2017), Efecto del co-cultivo en el desarrollo de embriones de alpaca (*Vicugna pacos*) producidos por fecundación *in vitro*. Tesis para optar al título de Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de Huancavelica.

Meintjes M. Incubadoras de CO₂ y Low-O₂ de Peter N., Varghese A., Agarwal A. Fertilización *in vitro* (2019), 2da Edicion, Editorioa Springer, Pág. 85-94. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-43011-9>

Mellisho E., Rivas V., Ruiz J., 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, R. (2012), Producción y Evaluación de Embriones por Superovulacion Mediante la Utilización de la eCG y FSH, en Alpacas Huacaya (*Vicugna pacos*) a

2730 m.s.n.m. *Tesis para Optar Título de Médico Veterinario, Universidad Nacional San Cristobal de Huamanga. Pág. 1-99.*

Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsøe, K., Ramsing, N. y Remohí, J. (2011). The use of Morphokinetics as a Predictor of Embryo Implantation. *Human Reproduction Vol 26*, 2658-2671. doi:<https://doi.org/10.1093/humrep/der256>.

MINAGRI. (2018), Situación de la Alpaca en el Perú. Sumaq Alpaca, Lima, Perú. 3p. <http://repositorio.minagri.gob.pe/xmlui/handle/MINAGRI/268>.

Montag, M., Toth, B., Strowitzki, T. (2013), New Approaches to Embryo Selection. *Reprod Biomed Online*, 539–546. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.05.013.

Nasiri, N., Yazdi, P. (2015), An Overview of The Available Methods for Morphological Scoring of Pre-Implantation Embryos in *In Vitro* Fertilization. *Cell Journal (Yakhteh)*, Vol. 16, 397-405.

Or Y., Dar S., Shoham Z., Capítulo 1 Viaje de los gametos humanos *In Vitro*: 1978 a 2018 de Peter N., Varghese A., Agarwal A. (2019), Fertilización *in vitro*, 2da Edición, Editorial Springer, Pág. 2-5. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-43011-9>

Overström, E. (1996), *In Vitro* Assessment of Embryo Viability. *Theriogenology*, Volumen 45, 3-16. doi:[https://doi.org/10.1016/0093-691x\(96\)84625-5](https://doi.org/10.1016/0093-691x(96)84625-5).

Palma. (2008), *Biología de la Reproducción 2da Edición*. Mar de Plata-Argentina: Rebiotec, pág. 1-19, 237.

Pacheco J., Vélez V., Pezo D. (2016), Evaluación de la Eficiencia de la Transferencia de Embriones Interespecie entre Alpacas y Llamas Obtenidos por Ovulación Simple. *Rev Inv Vet Perú* 27(1), 64-69. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v27i1.11464>.

Palomino W., Contreras M., Olaguivel C. (2020), Efectos de la Suplementación de dos Agentes en Medio de Fecundación para la Producción *in vitro* de Embriones en Alpacas (*Vicugna pacos*). *Spermova*, 10(11). Pág. 32-37. doi:10.18548/aspe/0008.05.

Paredes A. (2014), Efecto de la Congelación en la Sobrevivencia y la Viabilidad de

Embriones de la Alpaca. *Puno-Peru: Repositorio Institucional UNA - PUNO*.

Pérez G., Zevallos P., Pérez H. (2017), Comparación de Sistemas de Cultivo de Embriones de Alpacas. *Rev. Investig. Altoandin*, Vol 19 N° 2. Pág. 157-164.

Pérez G., Zevallos P., Pérez H. (2018), In vivo culture of alpaca embryos in the oviduct versus embryo culture *in vitro*. *Puno-Perú. Spermova* 8(2). Pág. 138-143

Picha Y., Tibary A., Memon M., Kasimanickam R., Sumar J. (2013), Chronology of early embryonic development and embryo uterine migration in alpacas. *Theriogenology*. Mar 1;79(4):702-8. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.11.027. Epub 2013 Jan 3. PMID: 23290313.

Pollet-Villard, Levy R. (2018), Qualité de l'air: impact sur les résultats et les pratiques au laboratoire de FIV, Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie. Volume 46. Issues 10–11. 2018, Pages 713-728, <https://doi.org/10.1016/j.gofs.2018.09.011>.

Quispe E., Alfonso A., Flores A., Guillen H. y Ramos Y. (2009), Bases para un Programa de Mejora de Alpacas en la Región Altoandina de Huancavelica-Perú. *Archivos de Zootecnia*. En E. Quispe, J. Mueller, J. Ruiz, L. Ruiz, & G. Gutierrez, *Actualidades sobre Adaptacion, Produccion, Reproduccion y Mejora Genetica en Camelidos*, Perú: Grafica Industrial E.I.R.L. Huancayo. Pág. 93-108.

Ratto M., Berland M., Huanca W., Singh J., Adams G. (2005). *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes. *Theriogenology* 63, Pág. 2445–2457.

Ressaissi, Y., Anzalone, D., Palazzese, L., Czernik, M. y Loi, P. (2021). The impaired development of sheep ICSI derived embryos is not related to centriole dysfunction. *Elsevier*. Vol. 159. Pág. 7-12.

Rocha J., Passalia, F., Matos F., Maserati M., Alves M., Almeida, T. y Nogueira, M. (2016), Métodos para Evaluar la Calidad de los Embriones de Mamíferos: ¿Qué tan lejos estamos del estándar de oro? *Reproducción Asistida JBRA* 20(3) Pág. 150-158. doi:doi: 10.5935/1518-0557.20160033.

Rondeau M., Guay P., Goff A. y Cooke G. (1995), Evaluación del Potencial Embrionario

Mediante Evaluación Visual y Metabólica. *Theriogenology*. Vol. 44. Pág.351-66. doi:10.1016 / 0093-691x (95) 00190-j.

Ruiz J. (2022), Biotecnologías Reproductivas en Camélidos Sudamericanos. Colegio de Ingenieros del Perú. Lima-Perú. Pág. 153-180.

Ruiz J. (2008), Avances en Biotecnología Reproductiva Aplicada en la Hembra de los Camélidos Sudamericanos. En E. Quispe, J. Mueller, J. Ruiz, L. Ruiz, & G. Gutierrez, *Actualidades sobre Adaptación, Producción, Reproducción y Mejora Genética en Camélidos* (págs. 49-82). Perú: Grafica Industrial E.I.R.L. Huancayo.

Ruiz J. (2018), Producción y Transferencia de Embriones *in vitro* en camélidos sudamericanos: nuevas oportunidades y desafíos. *Spermova* 8(1), Pág. 54 - 60. Doi: 10.18548/asp/0006.06.

Ruiz J, y Artica M. 2021, Optimización de la fecundación *in vitro* para la conservación del material genético de las alpacas (*Vicugna pacos*) de la comunidad campesina de Carhuancho Distrito de Pilpichaca Provincia de Huaytará, Región Huancavelica. Informe Final de Proyecto FOCAM.

Salazar I. (2015), Embriología veterinaria: constitución y organización de la forma animal durante el desarrollo. 2a. edición. Universidad de Santiago de Compostela.

Santa Cruz R., Giuliano SM., Gambarotta MC., Morrell JM., Abraham MC., Miragaya MH., Carretero MI. (2016), Comparison of different methods of sperm selection of llama raw semen. *Anim Reprod Sci.* Oct; 173:8-12. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.08.001.

Sarzosa, S., Culcay, H. (2014), Evaluación de la Producción *in vitro* de Embriones de alpaca (*Vicugna pacos*) en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universidad técnica de Cotopax. *Tesis previa a la obtención del título de médico veterinario y zootecnista*. Pág. 1-82.

Scott L. (2002), Embryological Strategies for Overcoming Recurrent Assisted Reproductive Technology Treatment Failure. *Human Fertility*. 206-214.

Skidmore L., (2000). Embryo Transfer in the Dromedary Camel (*Camelus dromedarius*).

Recent Advances in Camelid Reproduction, 1-11.

Sjoblom C., Liperis G. Capítulo 7 Control de Variables de Peter N., Varghese A., Agarwal A. Fertilización in vitro (2019), 2da Edición, Editoria Springer, Pág. 57-65. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-43011-9>

Stelletta C., Ruiz J., Peruffo A., Capítulo 2 Morfogénesis intrauterina temprana del cerebro y caracterización neuroquímica del hipotálamo en el feto de alpaca de Ruiz, J. (2022), Biotecnologías Reproductivas en Camélidos Sudamericanos. Colegio de Ingenieros del Perú. Lima-Perú. Pág 31-60.

Swain J. (2014). Decisions for the IVF laboratory: comparative analysis of embryo culture incubators, *Reproductive BioMedicine Online*, Volume 28, Issue 5, Pages 535-547, ISSN 1472-6483, <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.01.004>.

Sugimura S., Akai T., Hashiyada Y., Somfai T., Inaba Y., Hirayama M., Yamanouchi T., Matsuda H., Kobayashi S., Aikawa Y., Ohtake M., Kobayashi E., Konishi K., Imai K. (2012), Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle. *PLoS One*. 2012; 7(5):e36627. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036627> PMID: 22590579

Summers M., Biggers J., (2003), Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues, *Human Reproduction Update*, Vol.9, No.6 Pag. 557-582,

Tanaka H., Ballarales P., Masaki J. y Kanagawa H. (1997), *Teoria y Practica de la Fecundacion In Vitro*. Japon: Agencia de Cooperacion Internacional de Japon.

Thompson J., Brown H., Sutton M. (2016), Measuring Embryo Metabolism to Predict Embryo Quality. *Reproduction, Fertility and Development*, 41–50. doi:doi: 10.1071/RD15340.

Tibary A., Anouassi A., Khatir H. (2005), Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids. *ELSEVIER, Theriogenology* 64, Pág. 618–638. Doi:10.1016/j.theriogenology.2005.05.016.

- Tibary A., Pearson L., Campbell A. (2015). Embryo transfer in Camelids Transferenciade embriones en camélidos. *Spermova* 5(2), Pág. 234-252.
- Trasorras V., Miragaya M. (2016), Factores que Afectan el Desarrollo de la Fecundación in vitro es Camelidos. *Spermova* 6(2), 104-106.
- Trasorras V., Carretero M., Neild D., Chaves M., Giuliano S. y Miragaya M. (2017), Production, Preservation, and Tansfer of South American Camelid Embryos. *Frontiers in Veterinary Science*. 1-14.
- Tribulo P., Tribulo A., Producción de Embriones in vitro Capitulo 23 de Galina C. Reproducción de animales domésticos (2021), Universidad Nacional Autónoma de Mexico (UNAM). <https://reproduccionanimalesdomesticos.fmvz.unam.mx/libro/capitulo23/autores.html>.
- Van Blerkom J., Hennigan C., Ombelet W. Capítulo 18 Diseño y desarrollo de sistemas simplificados y de bajo costo Tecnologías para FIV Clínica: Aplicaciones en Alta y Configuración de bajos recursos de Peter N., Varghese A., Agarwal A. (2019), Fertilización in vitro, 2da Edición, Editorial Springer, Pág. 183-200. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-43011-9>
- Van Soom A., Tanghe S., De Pauw I., Maes and D., de Kruif A. (2002), Function of the Cumulus Oophorus Before and During Mammalian Fertilization. *Reprod Dom Anim* 37, 144–151.
- VerMilyea M., Tanb L., Anthonya J., Conaghanc J., Ivanid K., Gvakhariae M. y Shenb S. (2014), Computer-automated time-lapse analysis results correlate with embryoimplantation and clinical pregna. *Reprod Biomed Online*. 729–736.
- Wale P., Gardner D. (2016), The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction, *Human Reproduction Update*, Volume 22, Issue 1, January/February 2016, Pages 2–22, <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv034>
- Wang Q., Sun Q. (2007), Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and

molecular predictors. *CSIRO PUBLISHING*. 1-12.

- Wong C., Chen A., Behr B. y Shen S. (2013), Time-lapse Microscopy and Image Analysis in Basic and Clinical Embryo Development Research. *Reproductive BioMedicine Online*, 120-129. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.11.003>.
- Wong C., Loewke K., Bossert N., Behr B., Jonge C. D., Baer T. y Pera R. (2010), Non-invasive Imaging of Human Embryos Before Embryonic Genome Activation Predicts Development to the Blastocyst Stage. *Nature Biotechnology*, volume 28, 1115–1121. doi:<https://doi.org/10.1038/nbt.1686>.
- Yang S.-H., Wu C.-H., Chen Y.-C., Yang C.-K., Wu T.-H., Chen P.-C. y Tsai, H.-D. (2018), Effect of Morphokinetics and Morphological Dynamics of Cleavage Stage on Embryo Developmental Potential: A Time-Lapse Study. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 57, 76-82. doi:[doi: 10.1016/j.tjog.2017.12.013](https://doi.org/10.1016/j.tjog.2017.12.013).
- Ng Yu EH., Yeung WS., Yee Lan Lau E., So WW, Ho PC. (2000), High serum oestradiol concentrations in fresh IVF cycles do not impair implantation and pregnancy rates in subsequent frozen-thawed embryo transfer cycles. *Hum Reprod*. Feb;15(2):250-5. doi: [10.1093/humrep/15.2.250](https://doi.org/10.1093/humrep/15.2.250). PMID: 10655293.
- Zhan Q., Ye Z., Clarke R., Rosenwaks Z., y Zaninovic N. (2016). Direct Unequal Cleavages: Embryo Developmental Competence, Genetic Constitution and Clinical Outcome. (H. U. Editor: Stefan Schlatt, Ed.) *PLOS ONE* 11(12), Pág. 1-19. doi:[doi: 10.1371/journal.pone.0166398](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166398).

Anexos

1.1. Anexo figuras



Figura 1. Obtención de ovarios a 37 °C



Figura 2. Aspiración de COCs.



Figura 3. Traslado de ovocitos a una placa Petri para su selección y lavado de COCs.



Figura 4. Medio de lavado de ovocitos.



Figura 5. Lavado y selección de COCs

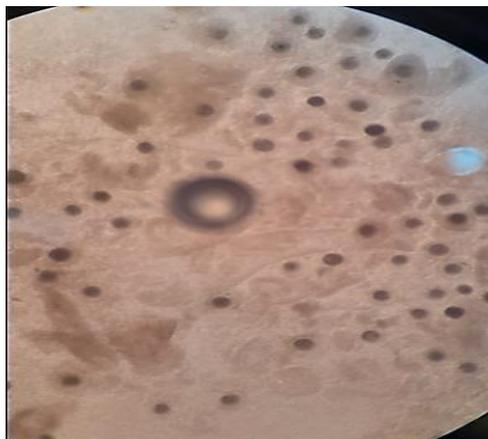


Figura 6. COCs de diferentes categorías.



Figura 7. Ovocito de grado I.

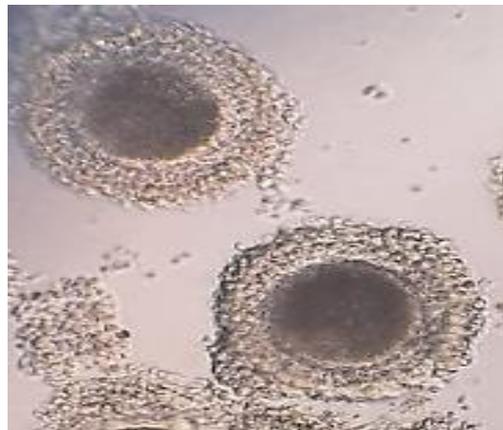


Figura 8. Ovocito de grado II.



Figura 9. Ovocito de grado III



Figura 10. Ovocito de grado IV.

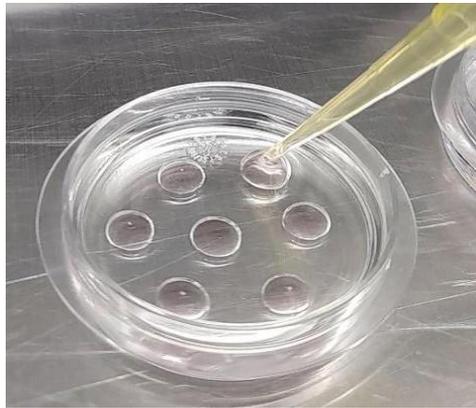


Figura 11. Preparación de placas de cultivo.



Figura 12. Incubadora de CO2 sistema convencional.

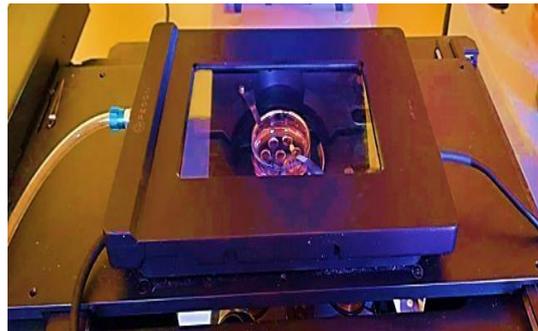


Figura 13. Incubadora del sistema continuo.



Figura 14. COC's maduros (expansión de las células del cumulus).



Figura 15. Obtención de espermatozoides epididimarios.

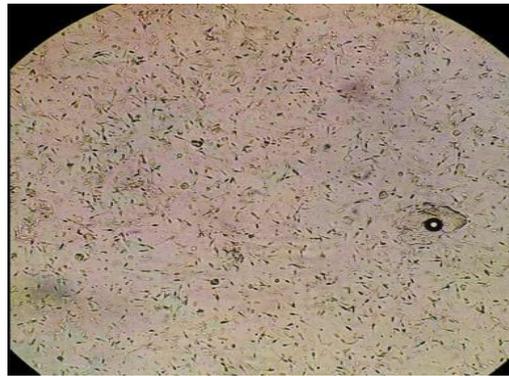


Figura 16. Verificación de la motilidad de espermatozoides.



Figura 17. Embriones a las 48 horas pos fecundación por sistema convencional

Nota: A) Embrión >4 blastómeras. B) Embrión con 4 blastómeras. C) Embrión con 2 blastómeras.

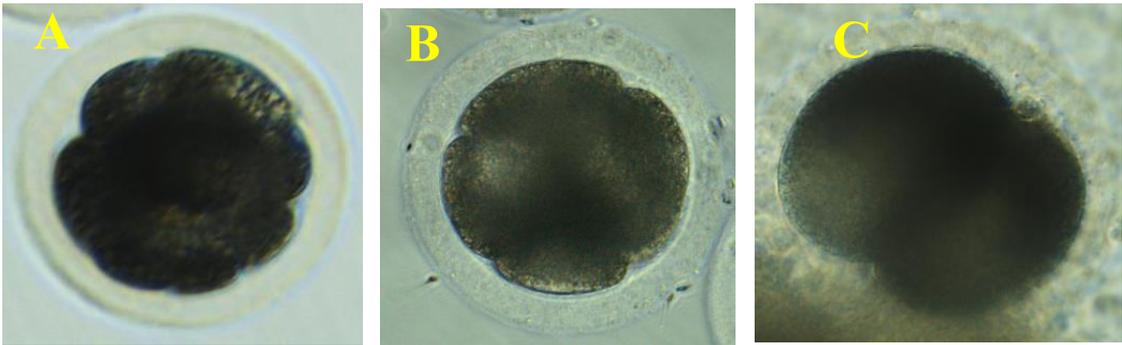


Figura 18. Embriones a las 48 horas pos fecundación por sistema continuo.

Nota: A) Embrión con > 4 blastómeras. B) Embrión con 4 blastómeras. C) Embrión con 2 blastómeras.

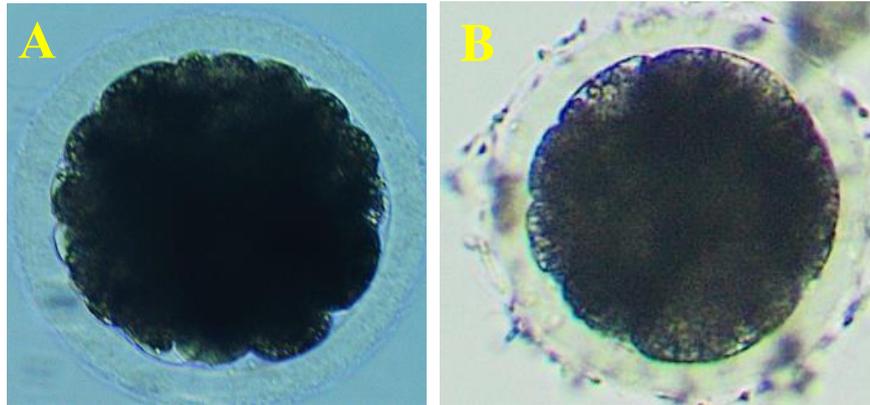


Figura 19. Embriones a las 120 horas pos fecundación por sistema convencional.

Nota: Embriones de estadio: A) Mórula. B) Embrión con 8 blastómeras. (40X).

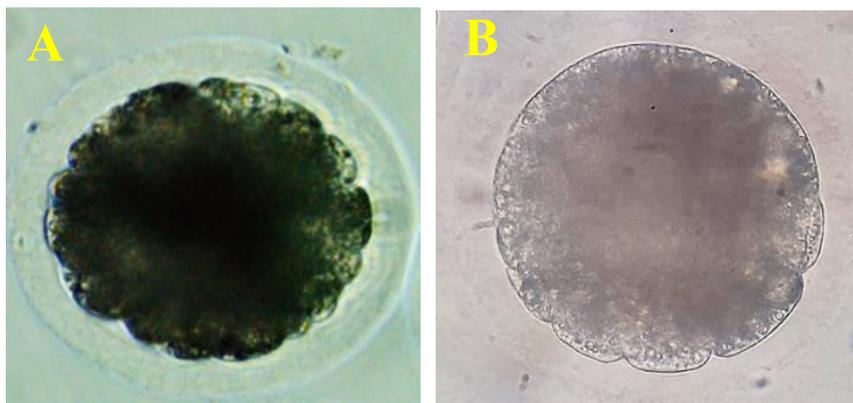


Figura 20. Embriones de 120 horas pos fecundación del sistema continuo.

Nota: Embriones del estadio: A) Mórula. B) Embrión con más 8blastómeras (40X).

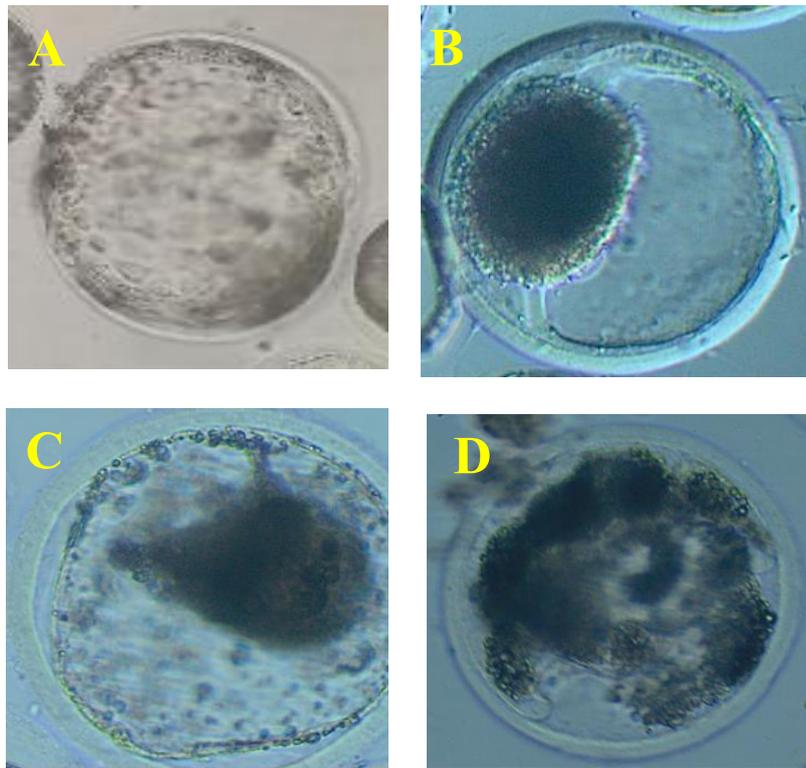


Figura 21. Embriones de 168 horas pos fecundación del sistema convencional.

Nota: Embriones según la calidad (40X): A) Embrión excelente. B) Embrión bueno. C) Embrión regular. D) Embrión malo

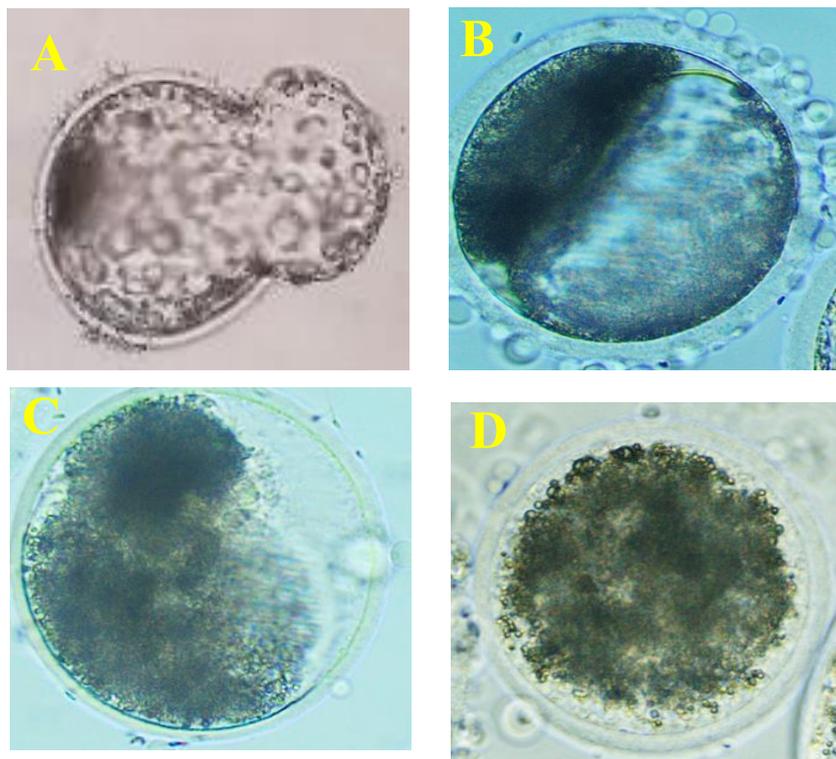


Figura 22. Embriones de 168 horas pos fecundación del sistema continuo.

Nota: Embrión de 7 días de acuerdo a su calidad (40X): A) Embrión excelente. B) Embrión bueno. C) Embrión regular. D) Embrión malo

1.2. Anexo tablas

Tabla 6.

Preparación de medio para lavado de espermatozoides (SP-TALP).

N°	Componentes:	concentración	100ml
1	NaCL	100 mM	0.584 g
2	Kcl	3.1 mM	0.0231 g
3	NaHCO ₃	25 mM	0.21 g
4	NaH ₂ PO ₄	0.3 mM	0.0036 g
5	Lactato de Na	21.6 mM	368 UI
6	CaCl ₂ (2H ₂ O)	2 mM	0.0294 g
7	MgCl ₂ (6H ₂ O)	0.4 mM	0.0081 g
8	Hepes	10 mM	0.238 g
9	Rojo fenol	0.50%	100 uL
10	Agua ultra pura		Completar a 100 mL