

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**



**“MÉTODOS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA Y TASA DE
FECUNDACIÓN *in vitro* EN OVOCITOS DE ALPACA
(*Vicugna pacos*)”**

Presentada por:

GUIULFO DURIEL MAMANI MANGO

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

Lima - Perú

2015

a

Victoriana y Mario, que gracias a ellos vivo este mundo,

Olger y Wagner hermanos míos,

Tía Sabina.

No sé si deba, sin embargo, aprovecho esta página concedida para describirles someramente el trajinar de este trabajo, que como muchos, se inició con una simple curiosidad de explorar embriones en alpacas; junto al Mg.Sc. Edwin Mellisho Salas se planificó, y entonces ¿Quién financia?; obligado a alcanzar la subvención de la EPG-UNALM no mucho pero suficiente para el inicio de la aventura, involucramos al Dr. Jaime Ruiz Béjar en la Universidad Nacional de Huancavelica, pues debía ser el lugar. Una vez en laboratorio ¡Es sólo obtener espermatozoides capaces de fecundar luego de ser congelados y escogidos!, pero no tan fácil, hubieron muchos equivoco viniéndose en perjuicio, claro, el costo de la aventura; sólo quien conoce aquellos fracasos y éxitos de obtener embriones in vitro podría ayudarme y así fue que José Mendoza Mallma termina involucrándose en esta aventura. Testificaron este andar Sugar, Rubén, Fredy, Paulo, Gerardo, Gregorio, Rene, Julio, Juan Carlos, Leandra, Gabriela, Delia, Graciela, Lisbeth y más amigos que al momento no llegan a mi memoria. Al final Mg.Sc. María García Salas, Ph.D. Enrique Flores Mariazza, Mg.Sc. Próspero Cabrera Villanueva y Ph.D. Juan Chávez Cossío quien revisó aún más esta redacción, dieron el sello final a este capítulo.

... gracias por lo que se dio en cada momento y, que perdure la amistad!

ÍNDICE GENERAL

| | Pág. |
|---|-------------|
| RESUMEN | |
| SUMMARY | |
| | |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 2 |
| 2.1 Ovogénesis | 2 |
| 2.1.1 Diferenciación celular en etapa fetal | 2 |
| 2.1.2 Multiplicación celular | 3 |
| 2.2 Foliculogénesis | 5 |
| 2.2.1 Maduración <i>in vivo</i> de ovocito | 9 |
| 2.2.2 Onda folicular | 10 |
| 2.3 Etapas de fecundación <i>in vitro</i> | 13 |
| 2.3.1 Recuperación de complejos cúmulos-ovocito | 13 |
| 2.3.2 Maduración <i>in vitro</i> de complejos cúmulus-ovocito | 15 |
| 2.3.3 Fecundación y cultivo <i>in vitro</i> de ovocito | 16 |
| 2.4 Métodos de recuperación de espermatozoides | 18 |
| 2.5 Métodos de evaluación espermática | 19 |
| 2.6 Selección de espermatozoides | 24 |
| 2.6.1 Método <i>Washing</i> | 27 |
| 2.6.2 Método <i>Swim-up</i> | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 2.6.3 Método <i>Percoll</i> | 28 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 30 |
| 3.1 Lugar | 30 |
| 3.2 Material biológico | 30 |
| 3.3 Obtención de espermatozoides congelados | 30 |
| 3.4 Evaluación de calidad espermática | 33 |
| 3.5 Selección espermática | 34 |
| 3.6 Proceso de fecundación <i>in vitro</i> | 37 |
| 3.7 Evaluación de fecundación <i>in vitro</i> | 40 |
| 3.8 Diseño experimental | 40 |
| 3.9 Análisis estadístico | 41 |
| IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 42 |
| 4.1 Características espermáticas post selección | 42 |
| 4.2 Evaluación de tasa de fecundación | 45 |
| V. CONCLUSIONES | 49 |
| VI. RECOMENDACIÓN | 50 |
| VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 51 |
| VIII. ANEXOS | 70 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Tabla 1: Propiedades de los diferentes métodos de separación y selección espermática. | 26 |
| Tabla 2: Características de espermatozoides de epidídimo de alpaca inmediato a la descongelación. | 42 |
| Tabla 3: Características de espermatozoides descongelados, de epidídimo de alpaca, evaluados posterior a los métodos de selección <i>swim-up</i> y <i>washing</i> . | 43 |
| Tabla 4: Tasa de fecundación <i>in vitro</i> (IVF) de ovocitos de alpaca, utilizando espermatozoides descongelados de epidídimo seleccionados mediante los métodos <i>swim-up</i> y <i>washing</i> . | 46 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Figura 1: Diagrama de meiosis en mamíferos (Handel y Schimenti, 2010) | 4 |
| Figura 2: Representación de los factores que intervienen en formación de células germinales primordiales (PGC), la ovogénesis y foliculogénesis. | 8 |
| Figura 3: Onda folicular ovárica de alpacas (Vaughan <i>et al.</i> , 2004). | 12 |
| Figura 4: Secuencia de fotografías para obtención de espermatozoides congelados. | 32 |
| Figura 5: Representación del proceso de selección de espermatozoides descongelados de alpaca a través del método <i>swim-up</i> , para proceso IVF. | 35 |
| Figura 6: Representación del proceso de selección de espermatozoides descongelados de alpaca, a través del método <i>washing</i> para proceso IVF. | 36 |
| Figura 7: Proceso de fecundación <i>in vitro</i> . | 39 |
| Figura 8: Diseño experimental de la aplicación de dos métodos de selección espermática <i>swim-up</i> y <i>washing</i> , en la tasa de fecundación de ovocitos de alpaca. | 40 |
| Figura 9: Características de espermatozoides descongelados de alpaca posterior a selección. | 45 |
| Figura 10: Tasas de fecundación <i>in vitro</i> en fotografías. | 48 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | Pág. |
|---|-------------|
| ANEXO 1: Medio para maduración de <i>complejos cúmulos-ovocito</i> (COC) | 70 |
| ANEXO 2: Medio para selección de espermatozoides/Sperm TALP. | 70 |
| ANEXO 3: Medio para fecundación <i>in vitro</i> /Fert TALP. | 71 |
| ANEXO 4: Preparación de stocks para medios utilizados en IVF | 72 |
| ANEXO 5: Motilidad progresiva espermática de epidídimo de alpaca, descongelado, antes y después por los métodos <i>swim-up</i> y <i>washing</i> ; según epidídimos y pajillas. | 73 |
| ANEXO 6: Vitalidad espermática de epidídimo de alpaca, descongelado, antes y después de selección a través de los métodos <i>swim-up</i> y <i>washing</i> ; según según epidídimos y pajillas. | 74 |
| ANEXO 7a: Concentración espermática de epidídimos de alpacas, antes y después de selección por <i>swim-up</i> y <i>washing</i> . | 75 |
| ANEXO 7b: Número de ovocitos por gota de fecundación y volumen de espermatozoides móviles progresivos recuperados por <i>swim-up</i> y <i>washing</i> para utilización en fecundación <i>in vitro</i> . | 76 |

- ANEXO 8: Tasa de fecundación de ovocitos inseminados con espermatozoides descongelados de epidídimo de alpaca y seleccionados mediante los métodos *swim-up* y *washing*. 77
- ANEXO 9: Análisis de varianza para métodos de selección espermática *swim-up* (*S*) y *washing* (*W*) de la motilidad espermática progresiva, y comparación de medias (*Tukey*). Analizados utilizando el paquete estadístico SAS versión 8.0 para Windows (1999-2001) por SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 78
- ANEXO 10: Análisis de varianza para métodos de selección espermática *swim-up* (*S*) y *washing* (*W*) de la vitalidad espermática y, comparación de medias (*Tukey*). Analizados utilizando el paquete estadístico SAS versión 8.0 para Windows (1999-2001) por SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 79
- ANEXO 11: Análisis de varianza para métodos de selección espermática *swim-up* (*S*) y *washing* (*W*) de la concentración espermática, y comparación de medias (*Tukey*). Analizados utilizando el paquete estadístico SAS versión 8.0 para Windows (1999-2001) por SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 80
- ANEXO 12: Análisis de varianza para métodos de selección espermática *swim-up* (*S*) y *washing* (*W*) de la tasa de segmentación embrionaria y, comparación de medias (*Tukey*). Analizados utilizando el paquete estadístico SAS versión 8.0 para Windows (1999-2001) por SAS Institute Inc., Cary, NC, USA 81

RESUMEN

La eficiencia reproductiva de alpacas machos está limitada por el pequeño tamaño testicular y largo periodo de eyaculación. Nuestro objetivo es evaluar el efecto de los métodos de selección espermática *swim-up* y *washing* sobre la tasa de fecundación *in vitro* de ovocitos de alpacas. Espermatozoides fueron obtenidos por *slicing* de cuerpos y colas de epidídimo de alpacas sacrificadas/beneficiadas (n=7), congelados en nitrógeno líquido y, una vez descongelados se evaluó motilidad progresiva ($25 \pm 5.96\%$), vitalidad ($32 \pm 5.57\%$) y concentración espermática ($66.5 \pm 24.4 \times 10^6$ espermatozoides ml^{-1}), enseguida seleccionados mediante *swim-up* se obtuvo $18\% \pm 6.78$, $22\% \pm 8.58$ y $13.5 \times 10^6 \pm 11.0 \times 10^6 \text{ml}^{-1}$ de motilidad progresiva, vitalidad y concentración espermática respectivamente, frente a $23\% \pm 4.83$, $29\% \pm 8.30$ y $52.0 \times 10^6 \pm 28.3 \times 10^6 \text{ml}^{-1}$ de motilidad progresiva, vitalidad y concentración espermática respectivamente, obtenido por *washing*; ambos mostraron similares características de motilidad progresiva y vitalidad ($p > 0,05$), pero el método *washing* proveyó mayor concentración espermática respecto a *swim-up*. De 335 ovarios de alpacas sacrificadas/beneficiadas, 839 complejo *cúmulus-ovocito* (COC) de grado I y II, se utilizaron en 13 sesiones de fecundación *in vitro*. Los COC fueron madurados en medio de maduración (27 horas con 5% de CO_2 y 38.5°C en gotas de $50 \mu\text{l}$ con 10 COC/gota), desnudados parcialmente por pipeteo suave y colocados en $45 \mu\text{l}$ de medio de fecundación; exponiéndolos luego a una concentración final de 397 y 484×10^3 espermatozoides móviles ml^{-1} para *swim-up* y *washing* respectivamente (sin agente capacitante), co-incubados por 72 horas y evaluados solo tasa de segmentación. Se observó 35% (147/418) de segmentación para *swim-up* frente a 37% (155/421) para *washing*, no habiendo diferencia significativa ($p > 0,05$), es decir, ambos métodos pueden ser usados en procesos de fecundación *in vitro* sin perjudicar la tasa de fecundación.

Palabras clave: Selección espermática, *swim-up*, *washing*, fecundación *in vitro*.

SUMMARY

The male alpacas reproductive efficiency is limited by the small size testicular and long period of ejaculation. Our objective is to evaluate the effect of the methods of sperm selection swim-up and washing on the rate of in vitro fertilization of oocytes alpacas. Spermatozoa were obtained by slicing bodies and tails epididymal alpaca slaughtered (n = 7), frozen in liquid nitrogen and after thawing progressive motility ($25 \pm 5.96\%$), vitality ($32 \pm 5.57\%$) and evaluated sperm concentration ($66.5 \pm 24.4 \times 10^6$ sperm mL⁻¹), once selected by swim-up was obtained $6.78 \pm 18\%$, $22\% \pm 8.58$ and $106 \pm 13.5 \times 11.0 \times 10^6$ mL⁻¹ motility, vitality and sperm concentration respectively, versus $23\% \pm 4.83$, $29\% \pm 8.30$ and $106 \pm 52.0 \times 28.3 \times 10^6$ mL⁻¹ motility, vitality and sperm concentration, respectively, obtained by washing; both showed similar progressive motility and vitality ($p > 0.05$), but the washing method provided greater sperm concentration relative to swim-up. 335 ovaries of alpacas slaughtered, 839 cumulus-oocyte complex (COC) Grade I and II, were used in 13 sessions of in vitro fertilization. COC were matured in maturation medium (27 hours with 5% CO₂ and 38.5 ° C in 50 µl drops of 10 COC / drop), partially denuded by gentle pipetting and placed in 45 µl of fertilization medium; then exposing them to a final concentration of 397 and 484 x 10³ motility sperm mL⁻¹ for washing and swim-up respectively (without capacitating agent), co-incubated for 72 hours and evaluated only rate segmentation. 35% (147/418) of segmentation was observed swim-up versus 37% (155/421) for washing, with no significant difference ($p > 0.05$), ie, both methods can be used in processes IVF without affecting fertilization rate.

Keywords: Sperm selection, swim-up, washing, IVF.

I. INTRODUCCIÓN

En el aspecto reproductivo los camélidos se caracterizan por su baja tasa reproductiva, teniendo las hembras un promedio de cuatro crías durante su vida y los reproductores machos una edad tardía al empadre, lo que limita en parte la posibilidad de desarrollar un programa de mejora genética consistente, ante esta situación, la implementación de técnicas de reproducción asistida pueden ser una excelente herramienta para lograr aumentar la confianza en la selección de las hembras y en consecuencia el mejoramiento genético de alpacas y llamas (Novoa *et al.*, 1999 y Huanca *et al.*, 2007).

La eficiencia de las técnicas de reproducción asistida como la inseminación artificial, en camélidos no son usadas masivamente como en otras especies, debido a que la colección de semen es complicada por la posición durante la monta, duración extendida de copula y la deposición intrauterina de semen (Bravo *et al.*, 2000 y Bravo *et al.*, 2013). En el caso de fecundación *in vitro*, se requiere más investigaciones para perfeccionar los sistemas óptimos en la producción de embriones *in vitro* evaluando los protocolos paso a paso, para incrementar la eficiencia de los programas de mejoramiento genético en los camélidos (Huanca *et al.*, 2007 y Trasorras *et al.*, 2013).

En procedimientos *in vitro*, los ovocitos maduros deben ser fecundados por espermatozoides viables y con alta capacidad fecundante; sin embargo, evaluaciones cualitativas y cuantitativas, de espermatozoides, antes y después, de procesos de selección espermática por diversos métodos, son escasos en camélidos, en virtud a ello el presente trabajo plantea los objetivos específicos de: Evaluar el efecto de los métodos de selección espermática *swim-up* y *washing* sobre: (i) características espermáticas y, (ii) tasa de fecundación *in vitro* de ovocitos de alpacas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 OVOGÉNESIS

La ovogénesis es un proceso complejo, regulado por un gran número de factores intra y extra ováricos, desde células germinales hasta ovocitos fertilizables (Figura 2). Las oogonias, que se originan de células germinales primordiales, proliferan por mitosis y forman los ovocitos primarios que son arrestados en el estado de profase de la primera división meiótica. Dentro de los ovocitos primarios, la síntesis y acumulación de ácidos ribonucleicos (ARNs) y proteínas a través de ovogénesis son esencial para crecimiento y maduración del ovocito, y además, crucial para el desarrollo interno del embrión después de la fertilización (Hillier *et al.* 2010 y Sanchez y Smitz, 2012).

2.1.1 DIFERENCIACIÓN CELULAR EN ETAPA FETAL

Los ovocitos se originan a partir de células germinales primordiales en el mesodermo extra-embriónico, cuyo desarrollo depende inicialmente de señales derivadas tanto del ectodermo extra-embriónico como del endodermo visceral. Migración, proliferación y colonización de las células germinales primordiales a las gónadas en desarrollo son controlados por muchos factores y dependerá también de la interacción de células germinales primordiales y sus células somáticas circundantes (Sánchez y Smitz, 2012).

Las células germinales de mamíferos no determinan su destino sexual en función de su constitución cromosómica XX o XY. Su destino sexual es dependiente del medio ambiente gonadal en el que se desarrollan. En un testículo fetal, las células germinales se comprometen a un programa de desarrollo espermatogénico durante la vida fetal, a pesar de que no entran en la meiosis hasta la pubertad. En un ovario fetal, las células germinales

se comprometen a ovogénesis entrando en profase de la meiosis I (Bowles y Koopman, 2010).

2.1.2 MULTIPLICACIÓN CELULAR

Después de colonizarla gónada, las células germinales primordiales pasan por una fase de proliferación mitótica con una citocinesis incompleta, que lleva a la formación de “nidos de células germinales”. Las ovogonias de los nidos de células germinales, están conectados por puentes intercelulares que forman grupos celulares o cordones corticales. Después de este evento y antes de la formación del folículo para divisiones mitóticas, las células germinales inician la meiosis y se convierten en ovocitos primarios (Pepling, 2006 y Sawyer *et al.*, 2002).

La meiosis es el proceso más importante para la formación de gametos haploides de células diploides. El cuerpo de un animal multicelular consiste principalmente de células diploides que no contribuyen información genética a la progenie. Sólo las células de la línea germinal se someten a meiosis, y forman gametos haploides en los órganos sexuales (Kholi y Hartsuiker, 2001). Un diagrama general se muestra en la Figura 1; donde las representaciones de células de color crema en la parte central de la figura, representan los acontecimientos de la meiosis. Los espermatoцитos y oocitos difieren notablemente en su desarrollo. Las distinciones se destacan en las etapas clave de los diagramas de las células germinales femenina (representaciones de color rosado en la figura) y masculinas (en color azul), entre paréntesis fuera del diagrama central. La meiosis es precedida por la replicación del ácido desoxiribonucleico (ADN) en una fase S pre-meiótica que es frecuentemente más largo que la usual fase mitótica S. La fase S es seguido por la larga profase I de la meiosis, durante el cual los cromosomas homólogos se aparean y se someten a la recombinación en una serie de eventos que definen las sub-etapas de la profase en la meiosis I. Estos eventos se acompañan de la sinapsis de los cromosomas en una estructura especializada meiótica, el complejo sinaptonémico (en la profase I, en la figura se muestra en color verde). En la metafase de la primera división meiótica (metafase I), se muestra el quiasma con la finalidad de mantener los cromosomas homólogos en una orientación bipolar. La primera, división meiótica (reduccional) separa los homólogos (anafase I y telofase I). El resultado es; dos células (o, en hembras, una célula con un

cuerpo polar, que se muestra como una pequeña esfera amarilla), estos son los gametocitos secundarios: Cada uno tiene contenido haploide de cromosomas, pero cada cromosoma todavía se compone de dos cromátidas. La segunda división meiótica es ecuacional: En las células germinales masculinas las cromátidas se separan para formar espermátidas inmaduras, cada uno de los cuales contiene el número de cromosomas haploides ($1n$); en las células germinales femeninas de la segunda división meiótica se produce después de la fecundación, donde el óvulo fecundado contiene dos pronúcleos haploides, uno paterno (azul) y el otro materno (rosado), así como tres cuerpos polares (Handel y Schimenti, 2010).

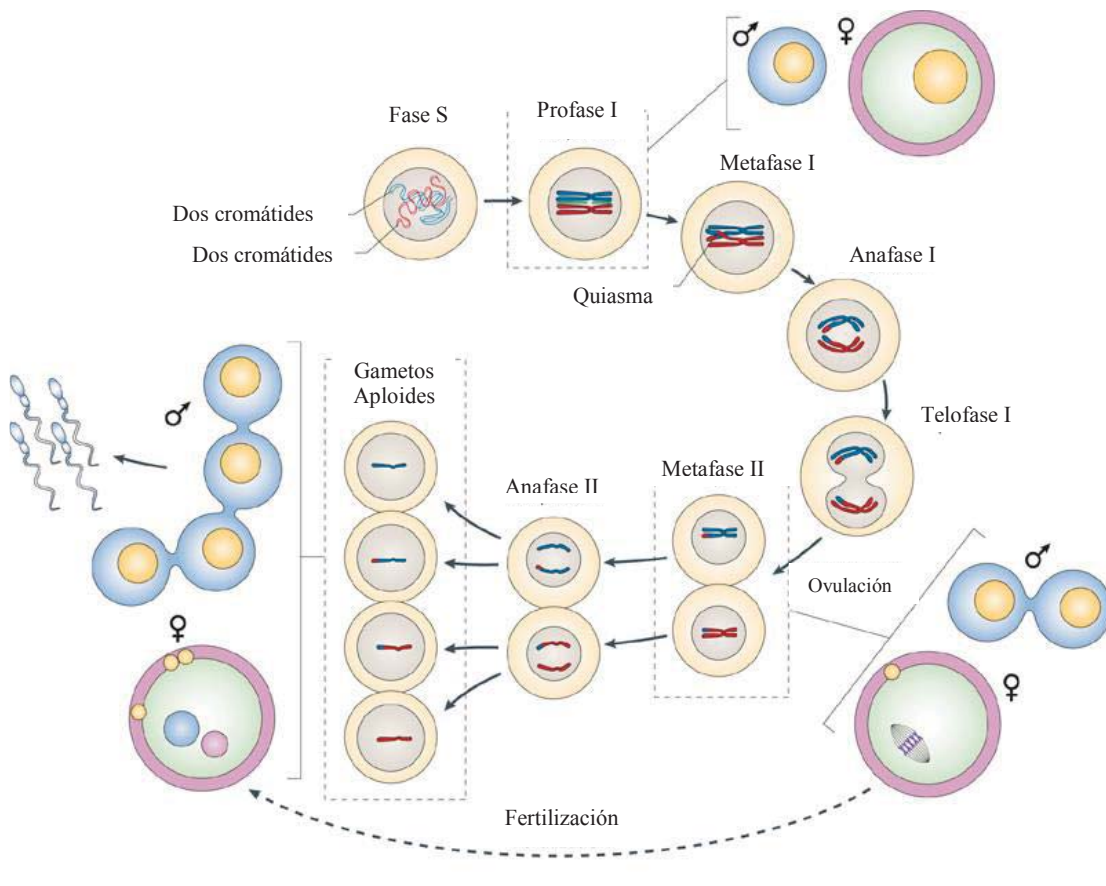


Figura 1. Diagrama de meiosis en mamíferos (Handel y Schimenti, 2010).

Es decir, la meiosis se inicia en un estado de profase, una compleja fase que es subdividida en cinco estados: leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis. Dentro del primer periodo de la profase una serie de eventos cruciales ocurren, involucrando el apareamiento de cromosomas homólogos, sinapsis (estrecha relación entre estos

cromosomas), y recombinación o “*Crossing over*” (intercambio de material genético). Subsecuentemente, los ovocitos progresan al estado de diploteno e ingresan dentro de una prolongada fase restante llamada dictioteno (Hunt y Hassold, 2008).

2.2 FOLICULOGÉNESIS

El folículo es la unidad estructural y funcional de los ovarios. La foliculogénesis se define como el proceso de formación, crecimiento y diferenciación folicular, abarca desde el estadio de folículo primordial hasta el de folículo pre-ovulatorio (Gigli *et al.*, 2006).

Paralelo al inicio de crecimiento de los ovocitos, las células somáticas circundantes comienzan a proliferar y las células aplanadas de la granulosa se convierten en cúbicas encerrando la célula germinal en varias capas. Esta fase inicial de crecimiento de los ovocitos y el desarrollo del folículo pre-antral parece ocurrir independientemente de las hormonas gonadotrópicas. Una vez que el folículo ha acumulado unos pocos miles de células de granulosa para formar una estructura multilaminar sólida, el espacio extracelular se expande para formar una cavidad llamada antro, presumiblemente en respuesta a la regulación hormonal endógena (Buccione *et al.*, 1990).

La formación de folículos primordiales, en humanos y bovinos, toma lugar durante la vida fetal iniciando con un ovocito incompletamente rodeado de células planas, llamadas células pre-granulosa cuyo desarrollo requiere de la habilidad de los ovocitos para separarse de los “nidos de células germinales” y asociarse a una capa de células precursoras de granulosa. La transformación de folículo primordial a folículo primario puede ser prolongada. Mientras el folículo primordial se caracteriza por la presencia de células planas, el folículo primario cuenta con una simple capa de células cuboides de granulosa. Los folículos pre-antrales son clasificados en diferentes formas y números, de acuerdo a las especies animales y autores, provocando variedad de nombres y términos (Palma *et al.*, 2012).

Los folículos primordiales permanecen detenidos en los ovarios hasta su reclutamiento en el crecimiento folicular. Cada día, un grupo de folículos primordiales son reclutados y,

estudios morfométricos, sugieren que inician crecimiento en el orden en el que ellos fueron formados (Hirchfiel, 1991). Consecuentemente, son primero transformados en folículos primarios después de pocos días o después de más de un año en roedores y de uno a cinco décadas en mujeres (Salha *et al.*, 1998).

La regulación de la actividad ovárica responde a un sistema integrado que engloba tanto señales extra-ováricas como factores intra-foliculares. El inicio del crecimiento del folículo primordial y las primeras etapas de la foliculogénesis puede ocurrir sin gonadotropinas, pero la hormona folículo estimulante (FSH) puede afectar la tasa de crecimiento del folículo pre-antral. El desarrollo de folículos antrales de 1 a 4mm, en el ganado ovino y vacuno, es completamente gonadotropina-dependiente. Como los folículos siguen madurando, hay una transferencia de la dependencia de la FSH a hormona luteinizante (LH), que puede ser parte del mecanismo involucrado en la selección de folículos para el crecimiento continuado (Webb *et al.*, 2004).

El desarrollo folicular, a lo largo de sus etapas más tempranas ha sido considerado ser gonadotropina independiente y esencialmente impulsado por los factores de secreción local (Figura 2). Cuando los folículos alcanzan la etapa pre-antral, su desarrollo a lo largo de este periodo y progresión a la etapa antral temprana aún dependen principalmente de factores intra-ováricos; sin embargo, a diferencia de las etapas anteriores, los folículos expresan respuesta FSH funcional y receptores de LH y son capaces de responder a las gonadotropinas, como se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* (Sánchez y Smitz, 2012).

El desarrollo de folículo primordial a folículo pre-antral básicamente involucra crecimiento celular, proliferación y diferenciación (Braw-Tal, 2002). Incluso, aun cuando los mecanismos que controlan la diferenciación de células de pre-granulosa a granulosa, durante la activación de folículos primordiales y la subsecuente proliferación de la granulosa son desconocidas, moléculas como *kit k* ligando (KL) y su receptor (c-Kit), factor de diferenciación de crecimiento 9 (DGF-9) y proteína morfogenética ósea 15 (BMP-15) están involucrados (Oktem y Oktay, 2008; Fortune, 2003; Moniruzzaman y Miyano, 2010).

La formación de una cavidad llena de fluido, el antro, dentro de una granulosa de varias capas, es característico de folículos antrales. El fluido antral puede servir como una fuente importante de regulación o sustancias moduladoras derivados de la sangre o las secreciones de las células foliculares, por ejemplo, gonadotropinas, esteroides, factores de crecimiento, enzimas, proteoglicanos y lipoproteínas. Durante el desarrollo del folículo, la producción de líquido antral se intensifica por el aumento de la vascularización folicular y la permeabilidad de los vasos sanguíneos, lo que es, junto con un enorme aumento en el tamaño de los folículos antrales. Pero las señales para la formación de antro aún no están bien entendidos (Hurk y Zhao, 2005).

En el folículo antral existen dos poblaciones específicas de células de la granulosa: (1) células de la granulosa del cumulus, organizados como un epitelio pseudo-estratificado que encierra el ovocito, y (2) células de la granulosa mural que comprende las capas internas de la pared del folículo y la formación de un epitelio pseudo-estratificado en contacto con la lámina basal, que es adyacente a la teca externa. Por último, en respuesta a la estimulación hormonal, dos eventos importantes se producen en el complejo celular ovocito-cumulus: (1) los ovocitos al completar su crecimiento completan la primera división meiótica y se detienen en metafase II, y (2) las células de la granulosa del cúmulo que rodean a las células germinales (ovocitos) se someten a expansión o mucificación, que consiste en la deposición de una matriz extracelular rica en ácido hialurónico que hace que las células se separen. Por último, el ovocito en metafase II, aún encerrado por las células del cumulus expandido, es ovulado en el oviducto listo para la fertilización (Buccione *et al.*, 1990)

Con la formación del antro, los pliegues se forman en algunas especies que aumentan la superficie interna del folículo. Esta superficie no tiene ninguna relación directa con el tamaño del folículo ya que el número de capas es muy variable (Roy y Greenwald, 1989).

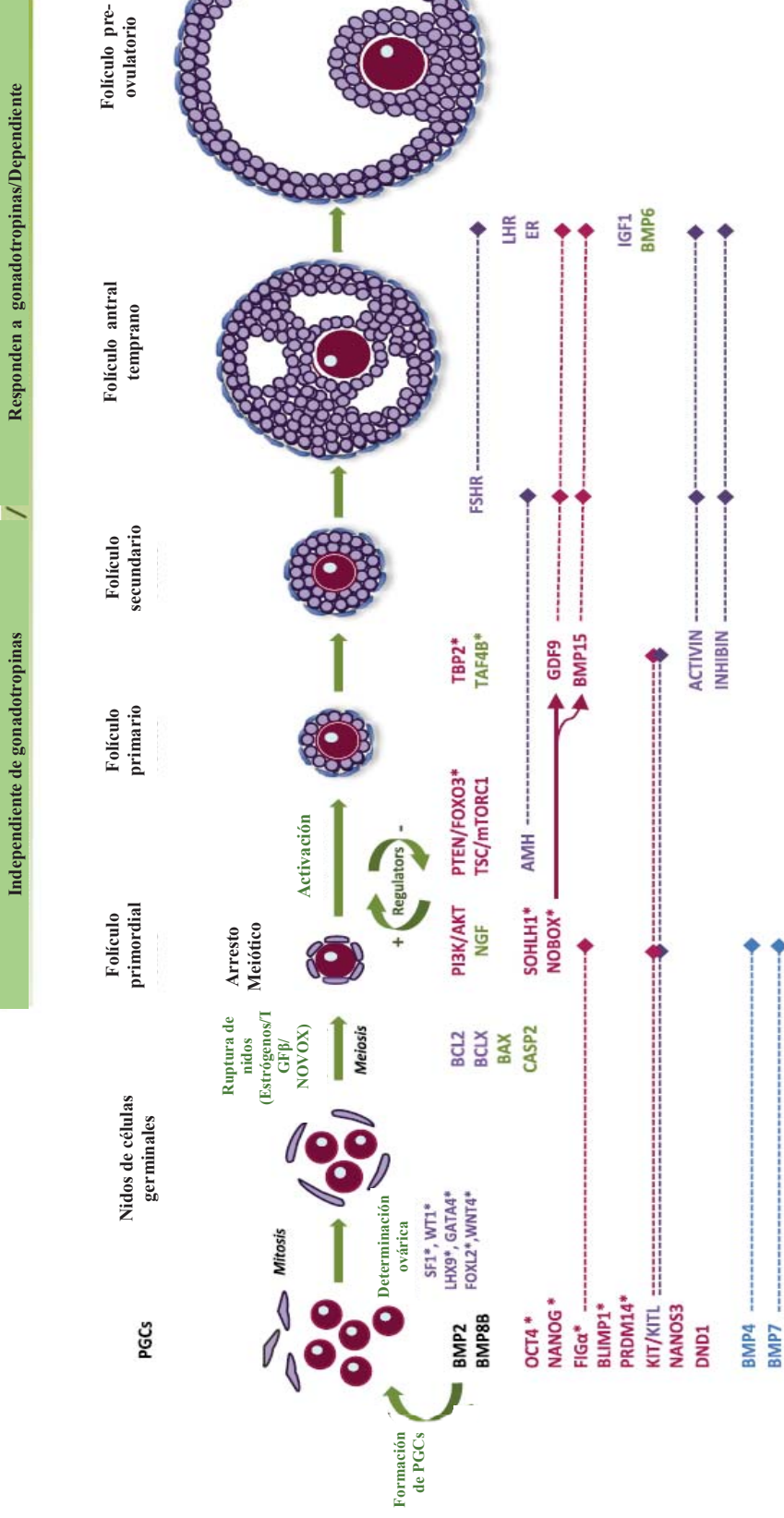


Figura 2: Representación de los factores que intervienen en formación de células germinales primordiales (PGC), la ovogénesis y foliculogénesis. Factores ováricos producidos por las células/estroma teca (en azul), las células somáticas/granulosa (en morado), las células germinales (en rojo) o en ambas células germinales y células de la granulosa (verde), ovocitos participan y regulan el desarrollo de los folículos en cada una de las etapas definidas en toda la foliculogénesis. Los factores de transcripción implicados se indican con un asterisco (*). Las proteínas del ectodermo extra embrionario que participan en la formación de PGC se indican en negro (Sánchez y Smitz, 2012).

2.2.1 MADURACIÓN *IN VIVO* DE OVOCITO

Los ovocitos adquieren gradualmente la maduración nuclear y citoplasmática durante el crecimiento. La competencia meiótica, es la capacidad de los ovocitos para reanudarla meiosis y convertirse en nuclearmente maduros, que es adquirido durante la foliculogénesis coincidiendo con la formación del antro; en ratones (Szybek, 1972) y humanos (Durinzi, 1995) se adquiere cuando han alcanzado aproximadamente el 80% de su tamaño final. La maduración citoplasmática, implica una acumulación de transcripciones y otros factores para ser fertilizado y convertirse en un embrión sano, capaz de continuar su desarrollo y en un plazo determinado producir una cría viva. (Sánchez y Smitz, 2012).

En folículos dominantes en crecimiento, los ovocitos permanecen en etapa de diploteno de la profase meiótica, comparable con la equivalente fase G2 de células mitóticas. *In vivo*, la reanudación de la meiosis se inicia con una oleada pre-ovulatoria de LH y sólo se produce cuando los ovocitos de los folículos dominantes (pre-ovulatorios) tienen un crecimiento completo y meióticamente competentes. Antes, y en el momento de la oleada de LH, el ovocito está rodeado por un cúmulo compacto. A partir de las células más internas del cumulus, numerosas proyecciones penetran a la zona pelúcida (ZP) que finalizan en el oolema con uniones *gap*. Poco después de la oleada de LH, se da la interrupción de estas uniones y, durante el período comprendido entre la oleada de LH y la ovulación el ovocito sufre una serie de cambios notables no sólo en su núcleo, sino también en su citoplasma, logrando su estado maduro. La maduración nuclear, en vacas y ovejas toma 24 horas aproximadamente, 44 horas en el cerdo y 36 horas aproximadamente en el caballo, comprende varios pasos (Hurk y Zhao, 2005).

La maduración nuclear abarca los procesos desde reanudar la meiosis de la profase I y conducir su desarrollo hasta metafase II. La maduración citoplasmática se refiere a los procesos que preparan el ovocito para la activación y el desarrollo de pre-implantación. Los ovocitos en estadio de vesícula germinal adquieren competencia para someterse a la maduración nuclear y citoplasmática, sin embargo la capacidad de desarrollo embrionario no parece estar estrechamente relacionada con la capacidad de maduración nuclear y, la

ruptura de vesícula germinal es probablemente esencial para la activación de algunos aspectos críticos de la maduración citoplasmática, fertilización y activación (Eppig, 1996).

La comunicación entre el ovocito y las células de la granulosa que lo rodea son de vital importancia, tanto para el desarrollo de los ovocitos como para la diferenciación de las células de la granulosa. Los ovocitos dependen de las células diferenciadas del cumulus, que les proporcionan los nutrientes y señales reguladoras necesarias para promover la maduración del núcleo y citoplasma de los ovocitos y en consecuencia la adquisición de la competencia en el desarrollo (Sánchez y Smitz, 2012). En ese sentido, el ovocito se considera que es “el conductor”, porque desde el momento de la organización folicular y continuando a través de la ovulación orquesta el desarrollo de un folículo mediante el control de la proliferación de células de la granulosa y la diferenciación en células productoras de compuestos adecuados como proteínas y esteroides, que conduce a mayor capacidad de respuesta a las gonadotropinas, diferenciación celular de la teca, la expansión del cumulus y el poner fin a la ruptura de la pared folicular. A su vez, las células de la granulosa son indispensables para el crecimiento de los ovocitos, la diferenciación, el estado meiótico nuclear, la maduración citoplasmática y la actividad transcripcional genómica (Hurk y Zhao, 2005).

Las interacciones químicas célula-célula, célula-matriz extracelular, afecta la producción hormonal y la expresión de factores de crecimiento de cada compartimento celular del folículo (Ovocito, granulosa y células de la teca), y también consolidan las funciones diferenciadas de líneas germinales y somáticas del folículo y también el proceso de coordinación de ovogénesis y foliculogénesis (Binelli y Murphy, 2010). Esta interdependencia y su persistencia son importantes durante la maduración de ovocitos para la adquisición del desarrollo de competencia de los ovocitos y para facilitar el desarrollo embrionario y fetal posterior (De Loos *et al.*, 1992).

2.2.2 ONDA FOLICULAR

A diferencia de otras especies domésticas, los camélidos tienen ciclos estruales; en ellos el estro y la ovulación no se manifiestan de manera repetitiva, cíclica y predecible (Hafez y

Hafez, 2000). Sin embargo, como en las diferentes especies, la evolución folicular puede ser dividida en tres fases: (i) Crecimiento, (ii) madurez, momento en el que se alcanza el diámetro de folículo preovulatorio (7–12 mm) y, (iii) regresión; siendo en la alpaca la duración media de cada una de ellas de 4 días (Bravo y Sumar, 1989).

Según Vaughan *et al.*, (2004) la emergencia de onda folicular se caracteriza por la aparición de 8 a 10 folículos con un tamaño menor a 3 mm, con uno o dos de ellos que continúan su crecimiento para convertirse en dominantes, mientras que los otros sufren regresión (Figura 3). Y las ondas foliculares no son interrumpidas por una fase luteal, si la hembra no es empadrada. En realidad la fase de crecimiento dura más y termina cuando un folículo se vuelve dominante y es el que madura, convirtiéndose los folículos subordinados en atrésicos, y son difíciles de individualizar con el ecógrafo; la fase de maduración implica que el folículo puede ovular y su tamaño es de 7 mm aproximadamente. En la fase de regresión el folículo disminuye de tamaño y en el ovario contra-lateral empiezan a crecer otros folículos, lo que implica una superposición de ondas foliculares, que sugiere una alternancia entre los dos ovarios en la presentación de folículos (80% en alpacas); con 44% de folículos dominantes en el ovario izquierdo, 56% en el derecho y 6% observados en ambos ovarios al mismo tiempo. La fase lútea puede ser corta, 10-12 días en el caso de una monta sin concepción, y extendida 11.5 meses en el caso de la preñez. La evaluación laparoscópica en alpacas de un año de edad, revela que los ovarios muestran folículos de tamaño ovulatorio tan igual como en hembras adultas (Bravo *et al.*, 2011).

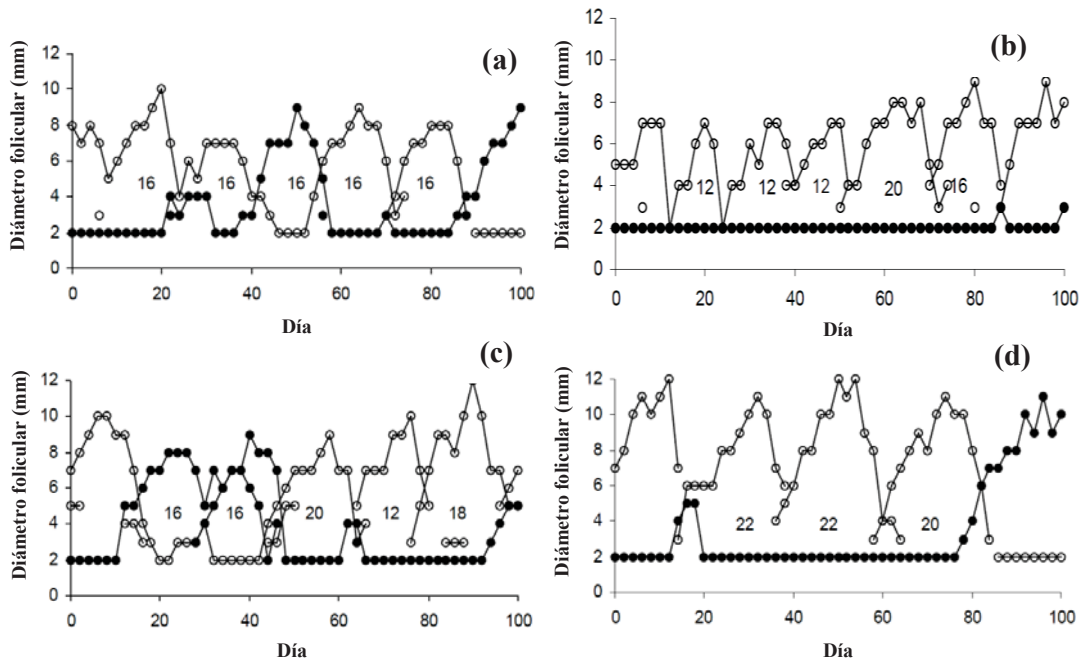


Figura 3: (a) Onda folicular ovárica de alpacas; en 22 observaciones durante 100 días (Ovario izquierdo (○) y ovario derecho (●)), los números indican el intervalo inter ondas para la onda con que son asociados; (b) Onda folicular ovárica de alpaca, en 326 observaciones durante 100 días; los números indican el intervalo inter ondas para la onda con que son asociados; (c) Onda folicular ovárica de alpaca, en 411 observaciones durante 100 días; los números indican el intervalo inter ondas para la onda con que son asociados (d) Onda folicular ovárica de alpaca en 9352 observaciones durante 100 días, los números indican el intervalo inter ondas para la onda con que son asociados (Vaughan *et al.*, 2004).

El intervalo entre ondas de los folículos no ovulatorios en alpacas es de 15.4 ± 0.5 días; 39% exhibían intervalo de 12 días, 32% de 16 días, 10% de 18 días, 13% de 20 días y 5% de 22 días. El máximo diámetro folicular es de 8.8 ± 0.3 mm y la duración del intervalo de onda folicular se asocia al diámetro máximo del folículo dominante (Figuras 4 y 5, Vaughan *et al.*, 2004). Asimismo, Adams *et al.* (1990) en llamas y Skidmore *et al.* (1995) en camellos, observaron una inversa relación entre el diámetro del folículo dominante más grande y el número de folículos detectados en crecimiento.

2.3 ETAPAS DE FECUNDACIÓN *IN VITRO*

La esencia de la fertilización *in vitro* es que los procesos que normalmente se producen en el ovario, ahora se llevan a cabo en el laboratorio (Eugster y Vingerhoets, 1999). La producción de embriones *in vitro* de animales de granja pasa por las etapas de maduración *in vitro* (IVM) de ovocitos, fertilización *in vitro* (IVF) de ovocitos madurados, y cultivo *in vitro* (IVC) de embriones. Los ovocitos pueden ser colectados de animales vivos (por laparotomía, laparoscopia, *ovum pick-up*) o de camal (por punción o seccionamiento) (Duzewska *et al.*, 2012).

2.3.1 RECUPERACIÓN DE COMPLEJOS CUMULUS-OVOCITO

La recuperación de ovocitos permite usar folículos no ovulatorios, que bajo condiciones fisiológicas normales se tornarían en folículos atrésicos lo cual es de mucha importancia para lograr el máximo aprovechamiento del potencial genético de una donadora mediante procedimientos *in vitro* (Gordon y Lu, 1990).

Existen varios métodos de obtención de ovocitos, el más sencillo es obtener de los ovarios después del beneficio de los animales, por medio de la aspiración de los folículos con una aguja y/o bomba de succión. Este método tiene la ventaja del reducido costo de obtención en relación a los que emplean aparatos eléctricos o electrónicos (Palma, 2001). Sin embargo, no se conoce si estos folículos recuperados, considerados pre-ovulatorios, están en fase de crecimiento o regresión, lo que afectaría la calidad de los ovocitos (Trasorras *et al.*, 2013).

Recuperación de ovarios de matadero.

Para la recuperación de ovocitos en alpacas y llamas *post mortem* existen dos métodos: (i) *slicing* de ovarios (Alpacas: Condori *et al.*, 2010; llamas: Del Campo *et al.*, 1994); y, (ii) aspiración folicular (Alpacas: Ruiz *et al.*, 2007; Gamarra *et al.*, 2008; Huanca *et al.*, 2006; llamas: Del Campo *et al.*, 1992; Ratto *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2007).

Por *slicing* de ovarios Del Campo *et al.*, (1994) recuperaron 27 complejos cumulo-ovocito (COC) por cada llama, con 84% viables para IVF; mientras que por aspiración de folículos, Ruiz *et al.* (2007), reportaron 3.5 COC recuperados por cada ovario de alpaca con 69% de aptos para FIV, Del Campo *et al.*, (1992) lograron 6.4 COC por llama aspirando folículos de 1 a 6 mm de diámetro; Ratto *et al.*, (2005) reportaron 2.2 COC por llama con un 95% (308/324) de viabilidad y Ruiz *et al.* (2007) recuperaron 2.2 COC de cada ovario de llama con 66% de aptos para IVF.

Recuperación repetida de COC de donantes vivas

La obtención de ovocitos de animales vivos asegura que estos sean recuperados repetidamente de folículos en la fase de crecimiento, también permite la producción de embriones de animales genéticamente superiores facilitando el uso intensivo de las hembras colectadas (Trasorras *et al.*, 2013), lográndose más crías por año de una misma donante y superando el límite biológico de una cría por hembra cada año (Ruiz, 2011). Sobre la recuperación vía *laparotomía* existen diversos reportes en alpacas (Gómez *et al.*, 2002; Miragaya *et al.*, 2002; Gamarra *et al.*, 2007; Ratto *et al.*, 2007). Gómez *et al.* (2002), obtuvieron una tasa de recuperación de COC de 83% (105/127) para animales tratados con FSH y 82% (163/198) para animales tratados con gonadotropina coriónica equina (eCG), Miragaya *et al.* (2002) lograron recuperar 87% y 59% de COC en hembras super-estimuladas y no super-estimuladas respectivamente. Gamarra *et al.* (2007) reportaron 7.6 COC y 7,0 COC recuperados por cada alpaca con 79.5% y 81% de COC de buena calidad para dos tratamientos de sincronización y estimulación ovárica y Ratto *et al.* (2007) obtuvieron una tasa de recuperación de 89% y 87% para animales tratados con FSH y eCG, respectivamente.

En llamas, se cuenta con los reportes de Sansinema *et al.* (2007) y Conde *et al.* (2008) con 94% de obtención de COC y 86.5% de COC recuperados en animales super-estimulados. Así mismo, con el método de obtención vía *laparoscópica* se ha obtenido una tasa de recuperación de 57% y 60% de COC en alpaca y llama, respectivamente (Ruiz y Correa, 2007).

Otra técnica de recuperación repetida en donadoras vivas es la recuperación de COC por el método *ovum pick-up* guiado por ecografía transvaginal. Brogliatti *et al.* (2000) en llamas reportan una tasa de recuperación de COC de 65 % en animales no estimulados frente a un 52 % en animales estimulados. Ratto *et al.* (2005) lograron recuperar 10.7 y 11.2 COC con una tasa de recuperación de 71% y 74% en llamas super-ovuladas con FSH y eCG, respectivamente, respuestas similares han sido reportados por Berland *et al.* (2011) con una tasa de recuperación de 77% de COC en llamas, G|amarra *et al.* (2008) con 6.0 y 6.1 COC en alpacas y Huanca *et al.*, (2006) con 55.5% de tasa de recuperación de COC en animales super-ovulados con FSH.

Ruiz y Ratto (2011) señalan que la técnica *ovum pick up* guiada por ultrasonografía al no ser invasiva permite la repetición de la misma sin causar daño a la hembra donante; sin embargo, tanto laparotomía y aspiración transvaginal guiada por ecografía tienen la desventaja de provocar un posible sangrado después de la aspiración y generar adhesiones posteriores en la bolsa ovárica debido a la liberación de fibrina (Trasorras *et al.*, 2013).

2.3.2 MADURACIÓN *IN VITRO* DE COMPLEJOS CUMULUS-OVOCITO

Previo a su fecundación, el ovocito en condiciones *in vivo* sufre cambios bioquímicos y metabólicos desde el estadio de profase I hasta el de ovocito secundario. Las gonadotropinas participan activamente en el desarrollo y maduración de los ovocitos en bovinos u otras especies, razón por la cual es muy importante suplementar con gonadotropinas los medios de maduración (Palma, 2001).

A pesar de que los ovocitos madurados *in vitro* muestran tasas de maduración nuclear, fecundación y división embrionaria similares a los ovocitos madurados *in vivo*, su capacidad de desarrollo es significativamente inferior. Mientras que el 85% de los ovocitos madurados *in vivo* son capaces de ser fecundados y dar origen a un embrión, solo un tercio de los ovocitos madurados *in vitro* obtienen esa capacidad. Esta diferencia se debería fundamentalmente al origen de los ovocitos (Blondin *et al.*, 2002). El origen de los ovocitos madurados *in vitro* es muy heterogéneo ya que se obtienen de folículos subordinados o en crecimiento, que no llegan a completar su maduración o capacitación,

lo que si ocurre *in vivo* en los folículos dominantes y mediante lo cual alcanzarán la capacidad de desarrollo completo (Hyttel *et al.*, 1997).

En llamas, utilizando como medio de maduración TCM-199; suplementado con 10% de suero fetal bovino, 0.5 µg/ml de FSH, 5 µg/ml de LH, 1 µg/ml de estradiol-17β, 25 µM de piruvato y 25 µg/ml de sulfato de gentamicina en incubadora con atmósfera húmeda a 38°C con 5% de CO₂; se alcanzó 62% de ovocitos en estadio de metafase II al ser madurados *in vitro* durante 36 horas versus 30% de ovocitos en metafase II después de 30 horas de maduración *in vitro* (Del Campo *et al.*, 1992; y 1994). Ratto *et al.* (1999) no encontraron diferencias estadísticas al evaluar tiempos de maduración *in vitro* de 26, 30 y 36 horas obteniendo 58%, 73% y 75% de ovocitos en estado metafase II y extrusión del corpúsculo polar respectivamente. Similares resultados son reportados por Miragaya *et al.* (2002) a 27 y 30 horas de maduración con 62% y 74% de ovocitos en metafase II, para COC obtenidos de llamas control y súper-estimuladas, respectivamente. Valores más altos han sido obtenidos por Ratto *et al.* (2007), quienes hallaron 77.7%, 80.6% y 80.4% de maduración *in vitro* cuando utilizaron 28, 30 y 36 horas en ovocitos de llama, no encontrando diferencias estadísticas significativas entre los 3 tiempos evaluados. Por otro lado Sansinema *et al.* (2003) obtuvieron un 52% de ovocitos maduros.

En alpacas, Ruiz y Correa (2007) maduraron ovocitos de alpaca durante 27 horas en un medio compuesto por TCM-199 suplementado con componentes, similares a los empleados para llamas, obteniendo una tasa de maduración de 75%. Asimismo, Santayana *et al.* (2012) obtuvieron 60% de maduración nuclear de ovocitos madurados por un lapso de 32 horas.

2.3.3 FECUNDACIÓN Y CULTIVO *IN VITRO* DE OVOCITO

La fecundación resume dos eventos iniciados por la penetración del espermatozoide a través de las diferentes capas celulares y no celulares que rodean al ovocito y culminan con la formación de ambos pronúcleos. La fecundación *in vitro*, conocida también como *inseminación* es el procedimiento por el cual los ovocitos maduros son cultivados junto con espermatozoides y así fecundados. Las células espermáticas, como ocurre en

condiciones fisiológicas, deben alcanzar su capacidad fecundante a través de un proceso de preparación *in vitro* con el objeto de seleccionarlos e iniciar su capacitación y desencadenar la reacción acrosómica; que se origina del aparato de Golgi de la espermátida. El acrosoma cuenta con las enzimas necesarias para que la célula espermática -ya activada- atraviese las cubiertas celulares del ovocito. Es importante destacar que la capacitación no es igual a la reacción acrosómica, la cual es un fenómeno de superficie en el espermatozoide y que ocurre solamente cuando este toma contacto con la zona pelúcida (Palma, 2001).

Mendoza *et al.* (2008) evaluaron en alpacas el efecto de dos métodos de selección espermática (*percoll* y *swim up*) en el desarrollo embrionario temprano *in vitro* reportando 36% y 43.9% de división (2 células) y 2.1% y 3.4% de blastocistos (día, 7), respectivamente. Resultados similares reportan Gamarra *et al.* (2008) con una tasa de *cleavage* de 27.1% (71/262) y tasa de blastocisto de 8.0% (21/262). Resultados superiores, reporta Santayana *et al.* (2012) en alpacas obteniendo 60.2% de segmentación y 17.0% de blastocistos (día, 7) con ovocitos madurados durante 32 horas. En llamas, Del Campo *et al.* (1994) reportaron 32% de segmentación y 6% de blastocistos, al trabajar con ovocitos y sistema de cultivo con co-cultivo.

Además se reporta, que los ovocitos de llama no requieren de agentes capacitantes (heparina, penicilamina e hipotaurina) en los medios de fecundación, ya que no se encontró diferencias estadísticas en la tasa de división embrionaria (2 células) 56% al uso de agentes capacitantes versus 50% de medio control sin capacitantes; asimismo, las tasas de blastocisto producidos *in vitro* al día 8 fueron de 35% y 47.4%, respectivamente (Conde *et al.*, 2008). Sin embargo, la tasa de fecundación es afectada por los crioprotectores utilizados en la crioconservación de semen de alpaca, 46.6% y 26.6% de división embrionaria se obtuvo al ser procesado con semen congelado con DMSO y glicerol, respectivamente (Terrerros *et al.*, 2012).

En camellos, Wani (2009) reporta una tasa de 43% a 60% de división embrionaria y tasa de blastocisto de 14% a 21%. La primera segmentación fue observado a las 16 horas después de la fecundación *in vitro*, encontrándose blastocistos tempranos a los 4 días y

blastocistos expandidos después de los 5 días, iniciándose eclosión a partir del sexto día de cultivo.

2.4 METODOS DE RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

Giuliano y Miragaya (2011) mencionan los diferentes métodos de recolección de semen practicados en camélidos sudamericanos hasta el momento. De acuerdo a diferentes investigadores en alpacas y llamas: (i) Colección de semen por vagina artificial (Sumar y Leyva, 1981; Gauly y Leidinger, 1995; Lichtenwalner *et al.*, 1996; Ferrer *et al.*, 1996; Von Baer y Hellemann, 1998; Bravo *et al.*, 2000; Huanca *et al.*, 2001; Delgado *et al.*, 2003; Aller *et al.*, 2003; Giuliano *et al.*, 2008; Morton *et al.*, 2009); (ii) colección por electroeyaculación (Mc Evoy *et al.*, 1992; Bourke *et al.*, 1995; Director *et al.*, 2007); (iii) de epidídimo (McEvoy *et al.*, 1992; Del Campo *et al.*, 1994; Bourke *et al.*, 1995; Morton *et al.*, 2007; Moina *et al.*, 2008; Santiani *et al.*, 2008; Gamarra *et al.*, 2008; Mendoza *et al.*, 2008); (iv) por fundas vaginales (Mogrovejo, 1952; Director 2004); (v) esponjas vaginales (San Martin *et al.*, 1968); y, (vi) aspiración post cópula (Neely y Bravo 1997; Sansinema *et al.*, 2007).

La colección de semen en camélidos es uno de los principales factores limitantes para el desarrollo de la inseminación artificial en llamas y alpacas, así como para la evaluación de la capacidad reproductiva de los machos (Novoa y Leyva, 1996). Esta es muy compleja debido a: (i) La posición durante la monta; (ii) duración extendida de copula (5-50 min); y, (iii) la deposición intrauterina de semen (Bravo *et al.*, 2000). Debido a esas dificultades es que en la mayoría de los trabajos se recurre a coleccionar espermatozoides del epidídimo (Giuliano y Miragaya, 2011).

Los espermatozoides de epidídimo vienen siendo criopreservados o utilizados exitosamente para inseminación artificial, en especies como bovinos (Foote y Igboeli, 1968), equinos (Morris *et al.*, 2002), cabras (Blash *et al.*, 2000), conejos (Pauffler y Foote, 1968) y perros (Marks *et al.*, 1994). Los espermatozoides epididimales pueden ser recuperados de animales (recuperación *post-mortem*) muchas horas o días después de muertos (Wani y Wani, 2003; Kaabi *et al.*, 2003), ello provee una oportunidad para usar

valioso material genético, a través de tecnologías de reproducción asistida o su preservación (Wani, 2009).

El epidídimo tiene fundamentalmente dos funciones, la maduración y el almacenamiento espermático (Chenoweth, 1997; Mortimer, 1997). Los espermatozoides maduran y adquieren su capacidad fecundante en la cabeza y el cuerpo del epidídimo y se almacenan en la cola del epidídimo (Amann y Schanbacher, 1983; Robaire y Hermo, 1988; Robaire y Viger, 1995). Con esta consideración, es importante señalar que se podrían obtener espermatozoides viables provenientes de la cola del epidídimo con movilidad y capacidad fecundante, poco tiempo después de la muerte del animal, pudiéndose ser procesados y congelados para su posterior uso en inseminación artificial (Albers y Barrios, 2006).

Los espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo de la alpaca tienen baja motilidad en relación a la encontradas en otras especies de mamíferos, debido probablemente a los “factores decapacitadores” que se encuentran aún en la superficie de la membrana plasmática y solo serán removidos cuando estos se depositen en el tracto genital de la hembra (Gonzales *et al.*, 2008).

2.5 MÉTODOS DE EVALUACIÓN ESPERMÁTICA

El semen es uno de los fluidos biológicos más variables que existen (Lewis *et al.*, 1997), ya que los espermatozoides son capaces de cambiar su comportamiento en respuesta a sutiles cambios ambientales, como métodos de procesamiento, conservación, temperatura, etc.; por ello, los científicos en reproducción animal se enfrentan a un gran reto a la hora de valorar la calidad seminal y comparar sus resultados con los de otros estudios, debido en parte a la ausencia de un protocolo estándar de valoración (Gravance *et al.*, 1998). Así en investigaciones realizadas por Rodríguez-Martínez *et al.* (1997), llegan a la conclusión de que el mejor indicativo para evaluar la capacidad fecundante de una muestra de semen es, la tasa de división embrionaria (*cleavage*), mientras que las tasas de blastocisto (desarrollo embrionario temprano) depende de múltiples factores y en gran medida de las condiciones de cultivo.

El objetivo es identificar algún parámetro cinético, morfológico o bioquímico que indique el estado de la célula espermática en un momento dado que pueda ser correlacionado con la calidad del eyaculado y fertilidad; sin embargo, las técnicas de contrastación de la evaluación del semen, tanto para la utilización en investigación como en la práctica deben ser precisas, sencillas, rápidas y económicas (Quintero, 2003).

La fertilidad potencial de una muestra de semen depende de varios factores tales como: adecuado número de espermatozoides viables, morfológicamente normales y funcionalmente competentes, capaces de alcanzar el oviducto y establecer un reservorio oviductal de llevar a cabo la fecundación y contribuir al desarrollo embrionario. La evaluación del semen mediante técnicas *in vitro*, para tener algún valor predictivo de su capacidad fecundante *in vivo*, debería incluir el estudio de tantas características espermáticas como sea posible, especialmente cuando se trata de dosis de semen congelado o cuando se están evaluando nuevos métodos de crioconservación (Muiño, 2008).

El análisis de semen clásico permite realizar una primera evaluación rápida de la calidad espermática, ayudando en la predicción su potencial de fertilidad, y la identificación de posibles causas de infertilidad. Aunque no hay un consenso sobre la eficacia de las diferentes pruebas utilizadas en cuanto a predicción de la fertilidad del macho. El espermiograma sigue siendo un método muy utilizado que permite valorar la calidad de las muestras seminales correspondientes a diferentes especies. No obstante, en ocasiones, los resultados de los parámetros espermáticos del espermiograma clásico pueden no ser suficientes para determinar con exactitud la capacidad fecundante de un eyaculado (Larsson y Rodriguez-Martinez, 2000). Éste análisis clásico de una muestra espermática se centra en tres parámetros: el conteo de espermatozoides, la motilidad espermática y morfología de los espermatozoides; los que se puede realizar fácilmente, mientras que los análisis más detallados con respecto al estado de ADN de esperma y las mitocondrias, o la presencia de posibles marcadores de apoptosis requiere más protocolos elaborados (Ramalho-Santos, 2007).

Motilidad espermática

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

Para determinar motilidad comúnmente se utiliza microscopía con contraste de fase de luz, para determinar el porcentaje de espermatozoides que representa un patrón de progresivo de movimiento rectilíneo, movimiento percibido como “normal”. Esta estimación se realiza ya sea “subjetivamente” (aunque a menudo por un operador con experiencia) o “objetivamente”, utilizando instrumentos con ayuda computarizada (CASA), que ahora son menos costosos y por lo tanto más generalizadas. La evaluación subjetiva es práctico, barato y permite la eliminación de los eyaculados que representan pobre motilidad de espermatozoides, lo cual es un buen indicador clínico para potencial sub-fertilidad o infertilidad (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2008).

Viabilidad espermática

La viabilidad espermática refleja el grado de integridad de la membrana plasmática y acrosomal del espermatozoide, parámetro que ha sido previamente asociado con la fertilidad potencial de una muestra de esperma. La evaluación de la integridad de la membrana plasmática es una prueba fundamental dentro del espermiograma debido a la importancia que tiene esta estructura en el mantenimiento del espermatozoide vivo (Mocé

y Graham, 2008). Además, la integridad de la membrana espermática no solo es fundamental para el metabolismo espermático, sino que es imprescindible en varios eventos de la fecundación como la capacitación, la reacción del acrosoma o su fusión con el ovocito (Quintero-Moreno *et al.*, 2003). También las pruebas funcionales como la prueba de endosmosis HOST (*hyposmotic swelling test*) permiten evaluar la integridad de la membrana plasmática, valorando su funcionalidad al comprobar la resistencia osmótica del espermatozoide en medios hipo-osmóticos (Pérez-Llano *et al.*, 2003). Por cuanto la célula espermática posee la capacidad de captar o liberar agua según la osmolaridad del medio extracelular, informando de la óptima funcionalidad de su membrana plasmática y de la capacidad del espermatozoide para la distribución de fluidos dentro y fuera del mismo (Quintero-Moreno *et al.*, 2003).

Entre los métodos descritos para la valoración de la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide se describen técnicas de tinción como la eosina-nigrosina, eosina/azul de anilina, el verde/eosina, el tripán azul/giemsá o el amarillo naftol/eritrosina, las cuales se valoran bajo microscopía de campo claro, o microscopía de ópticas de contraste de Normarski o de contraste de fases. Otra técnica es la microscopía electrónica, tanto de transmisión como de barrido, que debido a su alto costo y su complejidad es poco práctica (Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000).

Actualmente el desarrollo de sondas fluorescentes y la utilización de la microscopía de fluorescencia o la citometría de flujo han permitido el uso de nuevas técnicas más precisas para evaluar los daños de la membrana plasmática del espermatozoide. Un ejemplo de ello es la combinación de sondas como el di-acetato de carboxifluorescencia o el SYBR-14 con el yoduro de propidio (Maxwell, 1996 y Pérez-Llano *et al.*, 2003).

Morfología espermática

La cabeza de los espermatozoides de mamíferos presenta importantes variaciones en la forma entre las diferentes especies. Por ejemplo, es ovoide y discoidal en conejo, toro y cerdo, falciforme en ratón, rata y hámster, y algo aplanado y elipsoide en el hombre. En cambio, es elíptica en el caballo (Samper, 2009). En cuanto al tamaño, también existen considerables diferencias, mientras que el espermatozoide humano presenta 5-6 μm de

longitud y 2,5-3,5 μm de ancho (WHO, 1999), el del caballo tiene una longitud de 6,62 μm y una anchura de 3,26 μm (Hidalgo *et al.*, 2005). Aunque en general se podría aceptar que la mayoría de los mamíferos presentan una población espermática morfológicamente homogénea (Gago *et al.*, 1999).

El eyaculado de la mayoría de animales domésticos se caracteriza por presentar un bajo porcentaje de morfo-anomalías, como por ejemplo el macho cabrío (5-15% de anomalías morfológicas). En cambio, el eyaculado del caballo presenta un porcentaje de anomalías morfológicas que llega a superar el 20% de anomalías en reproductores fértiles (Love *et al.*, 2000).

Posiblemente, la morfología espermática sea uno de los parámetros más importantes, junto con la motilidad, a evaluar en el eyaculado de nuestras especies domésticas. Existen numerosos trabajos de investigación que ponen de manifiesto la importancia de este parámetro, correlacionándolo con la motilidad espermática (Varner, 2008) y con la fertilidad (Jasko *et al.*, 1990). Concretamente, algunas morfo-anomalías han sido asociadas con una fertilidad reducida, como las anomalías de la pieza intermedia y las colas dobladas o enrolladas en espiral (Varner, 2008). Asimismo, cualquier defecto morfológico debido a un proceso de maduración espermático incompleto (por ejemplo defectos en la cola o pequeñas diferencias geométricas en la cabeza) puede originar a su vez un movimiento anormal que incapacite al espermatozoide para su progresión en el aparato genital femenino y la posterior fecundación (Dresdner y Katz, 1981).

La morfología espermática ha sido determinada mediante numerosas técnicas, aunque el método más sencillo corresponde a la fijación de una muestra espermática con soluciones de formaldehído o glutaraldehído y el posterior conteo de espermatozoides mediante microscopía de contraste de fase (Pinart *et al.*, 1999; WHO, 1999). Igualmente se han usado diferentes técnicas de tinción para hacer valoraciones bajo microscopía de campo claro. Entre los métodos de tinción más empleados se incluyen la eosina-nigrosina, el trypan azul y giemsa, el papanicolau y el *Spermac*®.

Al igual que los diferentes métodos de procesado de la muestra, existen diferentes sistemas de evaluación y clasificación de la morfología espermática (Pinart *et al.*, 1999); no

obstante, comúnmente se utilizan dos tipos de clasificación o la combinación de estas. Así, las anomalías pueden ser clasificadas en función de la estructura espermática (Jasko *et al.*, 1990): (i) Anomalías de la cabeza, (ii) de la pieza intermedia; y, (iii) de la cola; y en función de su origen (Varner, 2008): (i) Anomalías primarias; (ii) secundarias; y, (iii) terciarias. Las anomalías primarias tendrían su origen durante la espermatogénesis, dentro del epitelio seminífero testicular. Los mismos que son fácilmente detectados mediante evaluación morfológica y aportan información muy valiosa porque se considera que están, entre moderada y severamente relacionadas con la baja fertilidad de los sementales (Samper, 2009)

Aunque la valoración de las anomalías morfológicas utilizando los métodos referidos han demostrado ser un importante indicador de la determinación del descenso en la fertilidad en diversas especies, incluyendo los équidos (Brito, 2007), su subjetividad condiciona la interpretación de los resultados. Además, estos presentan una gran variabilidad intra e inter laboratorios, haciendo necesario la utilización de métodos de valoración morfológicos más objetivos como los sistemas CASA (Hidalgo *et al.*, 2005).

2.6 SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES

En condiciones naturales el tracto reproductivo de la hembra puede ser considerado como un órgano con doble acción filtrante, primero al permitir la separación de espermatozoides del plasma seminal y subsecuentemente en proveer barreras para evitar el paso de espermatozoides anormales (Taylor, 2008). Sin embargo se desconoce si las muestras espermáticas de pobre calidad resultan en una baja tasa de preñez porque: (i) el mecanismo de filtro natural elimina los espermatozoides anormales, restringiendo el número de estos para que ocurra la fertilización; o, (ii) el mecanismo de filtrado es abrumado por el número de espermatozoides anormales, resultando en la fertilización de los ovocitos por espermatozoides anormales y subsecuente falla en el desarrollo de los cigotos (Morrell, 2009).

En algunas especies el lugar del tracto femenino donde ocurre principalmente la selección es traspasado cuando el semen es naturalmente depositado directamente en el interior del

útero (porcinos, equinos, camellos, perros y otros), o cuando se utiliza la inseminación artificial depositando las dosis de semen en la cervix o útero (porcinos, ovinos, vacunos, equinos). En estas situaciones es de gran importancia la unión utero-tubárica como una barrera para el filtrado de espermatozoides de pobre calidad (Hunter, 2004).

La presencia de plasma seminal es considerada beneficiosa para la función espermática pero perjudicial para la sobrevivencia espermática. Es conocido que el plasma seminal contiene muchos factores que ayudan la permanencia de la función espermática, por ejemplo los factores de-capacitadores (Pérez-Pé 2001 y Björndahl *et al.*, 2005). Pero también otras sustancias por ejemplo, factores que inhiben la motilidad (Kordan *et al.*, 1998), que tienen un efecto restrictivo sobre el movimiento espermático *in vitro*, y especies oxígeno reactivas (ROS) que son perjudiciales para su prolongada sobrevivencia (Hammadeh, 2008). ROS son producidas por leucocitos y restos celulares, más importante, para muchos animales machos (restos citoplasmáticos en espermatozoides inmaduros, o por espermatozoides muertos o dañados). Altos niveles de ROS son asociados con infertilidad en humanos (Aitken y Clarkson, 1987), los bajos niveles son considerados prerrequisito para la ocurrencia de cambios en la membrana antes de la fertilización (Aurich, 2005; Morte 2008). Es así que, las tasas de fertilización *in vitro* de porcinos pueden ser mejoradas por la reducción de los niveles de ROS usando superóxido dismutasa o catalasa (Roca, 2005).

Varios mecanismos se han sugerido para imitar la selección de espermatozoides de buena calidad en el tracto reproductor femenino y así ajustarse a la definición de la biomimética (uso de tecnologías y/o procesos que imitan a un evento de origen natural). Estos mecanismos, activa o pasivamente, filtran espermatozoides del plasma seminal, imitando así el efecto de su migración lejos del sitio de deposición del semen, o permitiendo la elección de la mejor calidad de los espermatozoides del resto del eyaculado, como puede ocurrir en la unión útero-tubárica y en los oviductos *in vivo* (Morrell y Rodríguez-Martínez, 2009). Existen varios métodos para la selección de espermatozoides y la escogencia de uno de estos depende no sólo de la obtención de espermatozoides móviles, sino también de la complejidad de la técnica, el material, equipo requerido, el tiempo y los costos (Mortimer *et al.*, 1997).

Con el desarrollo de la fecundación *in vitro* y otras biotecnologías de reproducción asistida, la selección de espermatozoides ha comenzado a ser un importante procedimiento para obtener resultados óptimos. La selección de espermatozoides no sólo es necesaria para remover el plasma seminal y crioprotectores, sino que también es utilizada para obtener una fracción de espermatozoides con un mínimo de 70% de movilidad rectilínea progresiva de una muestra de semen (Urrego *et al.*, 2008).

Los requerimientos de espermatozoides viables para producir una fecundación exitosa pueden variar entre distintas especies, lugar de inseminación, técnica de reproducción asistida, etc. Asimismo, los volúmenes de eyaculado a procesar varían entre especies de 1 a 2 ml en el carnero, 20 a 50 ml en potro y 100 a 250 ml en el verraco, siendo este uno de los factores que afecta los costos de procesamiento. Existen varios trabajos científicos que indican los méritos de las técnicas de selección espermática (Tabla 1) utilizados para mejorar la calidad de semen previo a la inseminación artificial (IA), fecundación *in vitro* (FIV) y/o inyección intra-citoplasmática de espermatozoide (ICSI) en humanos y animales (Morrell y Rodriguez-Martinez, 2009).

Tabla 1: Propiedades de los diferentes métodos de separación y selección espermática.

| | <i>Lavado</i> (<i>Washing</i>) | <i>Migración</i> (<i>Swim up, swim down</i>) | Centrifugación coloide (<i>Coloides, Percoll®</i>) |
|----------------------------|-------------------------------------|---|---|
| Facilidad en uso | Simple | Simple | Requiere atención para detalles |
| Equipos requeridos | Centrifuga | Tubo especial | Centrifuga |
| Costo por muestra | Bajo | Bajo | Alto |
| Selección espermática | | Basado solo en motilidad | Basado en motilidad morfológica y viabilidad, calidad de cromatina. |
| Remoción de plasma seminal | Mayormente | Si | Si |
| Remoción de patógenos | No | No hay datos | Si |
| Restos celulares | Puede estar presente | Ausente | Ausente |
| Motilidad espermática | No hay datos | 10 a 20% | >50% |
| Remoción de leucocitos | No | Si | Si |
| Integridad de cromatina | Pobre | Pobre | Buena |

FUENTE: Morrell y Rodriguez-Martinez (2009).

2.6.1 MÉTODO WASHING

El lavado del semen mediante la sedimentación por centrifugación de los espermatozoides y su re-suspensión en un nuevo medio, es considerado como el método más rápido y eficaz para la eliminación de materiales indeseados (Gordon, 1994). No obstante, existen evidencias, especialmente en humanos, que demuestran que la sedimentación de una población de espermatozoides por centrifugación puede causar la producción de especies oxígeno reactivos (radicales superóxidos e hidroxilos) en el sedimento, lo que provocaría un daño irreversible en los espermatozoides, perjudicando así su capacidad de fecundación *in vitro* (Aitken y Clarkson, 1988).

Chauham *et al.* (1999) Sugieren que en el procedimiento de lavado por centrifugación de muestras de semen, no ocurre una “selección natural” de los espermatozoides de mayor motilidad, existe una incompleta separación de los espermatozoides de los otros componentes del plasma seminal debido a la forma, tamaño y densidad de las partículas presentes en el pellet que precipitan en conjunto con los espermatozoides, al realizar la centrifugación (Lessley y Garner, 1983).

Si bien los espermatozoides se separan de manera efectiva de la mayoría de los componentes de plasma seminal del eyaculado (Björndahl *et al.*, 2005; Hunter y Rodríguez-Martínez, 2004), no hay ninguna selección de fuentes potenciales de especies oxígeno reactivos (ROS) en el plasma seminal, perjudiciales para la viabilidad del esperma. Debido a esta técnica se han reportado daños de la cromatina, al menos para los espermatozoides humanos (Mortimer, 2000); aunque esto puede ser más debido a la centrifugación de semen en ausencia de antioxidantes, que a la técnica en sí. Dilutores en semen animal, especialmente de leche o dilutores a base de yema de huevo, por lo general contienen algunos antioxidantes que pueden mitigar el efecto del aumento de la liberación de ROS durante la centrifugación del semen. Sin embargo, los resultados de centrifugación en un pellet de esperma contiene células muertas, moribundas y anormales, así como espermatozoides viables (Hallap *et al.*, 2004), ya que todos los espermatozoides de la muestra original se concentran en este. Sin embargo, las ventajas del método *washing* son numerosas: Método rápido, económico y la alta tasa de recuperación alcanzada por este método (Avery y Greve, 1995).

2.6.2 MÉTODO SWIM-UP

Esta técnica fue desarrollada por Parrish *et al.*, (1984), en esta se seleccionan los espermatozoides en virtud de su movilidad intrínseca; para ello, el semen es depositado en el fondo de un tubo de ensayo con el medio adecuado y se incuba por espacio de una hora. Sólo los espermatozoides con mejor movilidad nadarán hacia arriba de tal manera que al momento de retirar el contenido de la parte superior del tubo se estarán seleccionando los espermatozoides vivos y con movilidad rectilínea progresiva (Parrish *et al.*, 1995; Dode *et al.*, 2002 y Kochhar *et al.*, 2003).

Desde su inicio, el procedimiento sufrió una serie de variantes a fin de mejorar su eficiencia cualitativa y cuantitativa. Los espermatozoides obtenidos después del tratamiento son altamente mótils (buena calidad), sin embargo, el rendimiento cuantitativo es bajo, lo que puede constituir una desventaja, porque puede requerir del uso de más de una pajueta de semen (Palma, 2001).

Esta selección se basa en la capacidad de los espermatozoides a ser móviles y, como tal, no proporciona ninguna selección basado en la morfología normal de la cabeza, la integridad de la cromatina (espermatozoides con cromatina intacta), o la viabilidad e integridad acrosomal (Somfai *et al.*, 2002). La principal desventaja de cualquier método de migración es la baja tasa de recuperación, por ejemplo, 10-20% (Hallap *et al.*, 2004).

2.6.3 MÉTODO PERCOLL®

En este método los espermatozoides se seleccionan en virtud de su velocidad potencial y su relativa alta densidad. El semen, diluido en medio de capacitación, es colocado en la parte superior del *percoll*®, el cual posee una concentración diferencial de 45 y 90%, procediéndose luego a su centrifugación, obteniendo espermatozoides viables concentrados en el fondo, quedando en las fases del gradiente los espermatozoides muertos o de baja movilidad, el plasma seminal y demás estructuras (Dode *et al.*, 2002; Kochhar *et al.*, 2003; Parrish *et al.*, 1995).

La técnica de preparación de semen bovino a través del gradiente diferencial de *percoll*[®] no altera ni la integridad de la membrana plasmática ni del ADN bajo unas condiciones de 10 minutos de centrifugación a 700 x g, por lo que se sugiere la utilización de este protocolo para la preparación espermática previo a la fertilización al no tener efectos deletéreos sobre la membrana plasmática y sobre el ADN; y podría evaluarse las tasas de división a dos células(*cleavage*) y blastocistos, utilizando dicho protocolo (Ángel *et al.*, 2009). Sin embargo, en sistemas de producción de embriones *in vitro* bovino, tratamientos con *percoll*[®] sobre espermatozoides descongelados, fueron causantes de bajas tasas de *cleavage* y blastocistos, debido probablemente a la polivinilpirrolidona (PVP) libre en el *percoll*[®] (Avery y Greve, 1995). De similar manera Chen y Bongso (1999) indican que el problema es, que algunos lotes de *percoll*[®] tienen efectos endotóxicos, razón por la que fueron descartados para el uso en técnicas de reproducción asistida humana.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR

El estudio se realizó, en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Universidad Nacional de Huancavelica (UNH), ubicada en la Avenida Universitaria 1420, localidad de Paturpampa, Huancavelica Perú. Geográficamente ubicada a 11° 59' 10" de latitud sur y 3 760 m.s.n.m.

3.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Las muestras biológicas (ovarios y testículos), fueron obtenidas del matadero Municipal de Huancavelica, ubicado a 11km de las instalaciones de la UNH. Se utilizaron un total de 14 epidídimos correspondientes a 7 alpacas machos adultos y 335 ovarios de alpacas jóvenes y adultas; ningún animal recibió tratamiento hormonal antes de su beneficio.

3.3 OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES CONGELADOS

Los testículos fueron trasladados desde el matadero a laboratorio en un recipiente isotérmico en un lapso no mayor a 3 horas desde el beneficio de los animales hasta su llegada al laboratorio. Inmediatamente cuerpos y colas de epidídimos fueron separados de cada testículo con la ayuda de una tijera y pinza simple hasta quedar libre de exceso de tejidos y restos sanguíneos, colocándolas en placas *petri* estériles, sobre una platina a 37°C. El método de recuperación de espermatozoides fue cortando en pequeñas porciones los epidídimos aislados (*slicing*), los que se suspendieron en 1500 µl de medio de dilución comercial (*Andro Med®*, *Minitübe*, *Germany*) y luego fueron sometidos a presión

mecánica suave y repetida con pinza simple forzando la salida de los espermatozoides desde los túbulos de epidídimo al medio de dilución (Figura 4).

Una vez recuperados los espermatozoides, estos fueron colocados en una cámara incubadora a 38.5°C, por un lapso de 15 minutos, necesarios para iniciar su movimiento progresivo para luego trasladarlos a refrigeración (5°C) por otros 15 minutos completando la dilución con 1500 µl del mismo dilutor (*Andro Med®*) previamente refrigerado. La mezcla final fue envasada en pajillas *cassou (IMV, France)* de 0.25 ml y sellada con alcohol polivinílico y mantenida en baño de agua a 5°C por un lapso de 5 minutos. La criopreservación de espermatozoides se realizó, exponiendo las pajillas a vapores de nitrógeno líquido, descendiendo la temperatura a una tasa de 29 grados/minuto durante 5 minutos, con la ayuda de un termómetro digital; dentro de una caja de tecnopor de 16 x 26 x 13 cm de ancho, largo y alto respectivamente, acondicionada con una parrilla y una ranura en el lado lateral largo que permite el ingreso y desplazamiento paralelo a la parrilla del brazo sensor del termómetro (Figura 4i), hasta llegar a -140°C y sumergirlo a nitrógeno líquido. Se puso nitrógeno líquido hasta una altura de 3 cm sobre la base de la caja. Finalmente, las dosis de espermatozoides fueron guardadas en tanque criogénico con nitrógeno líquido a -196 °C (Figura 4).

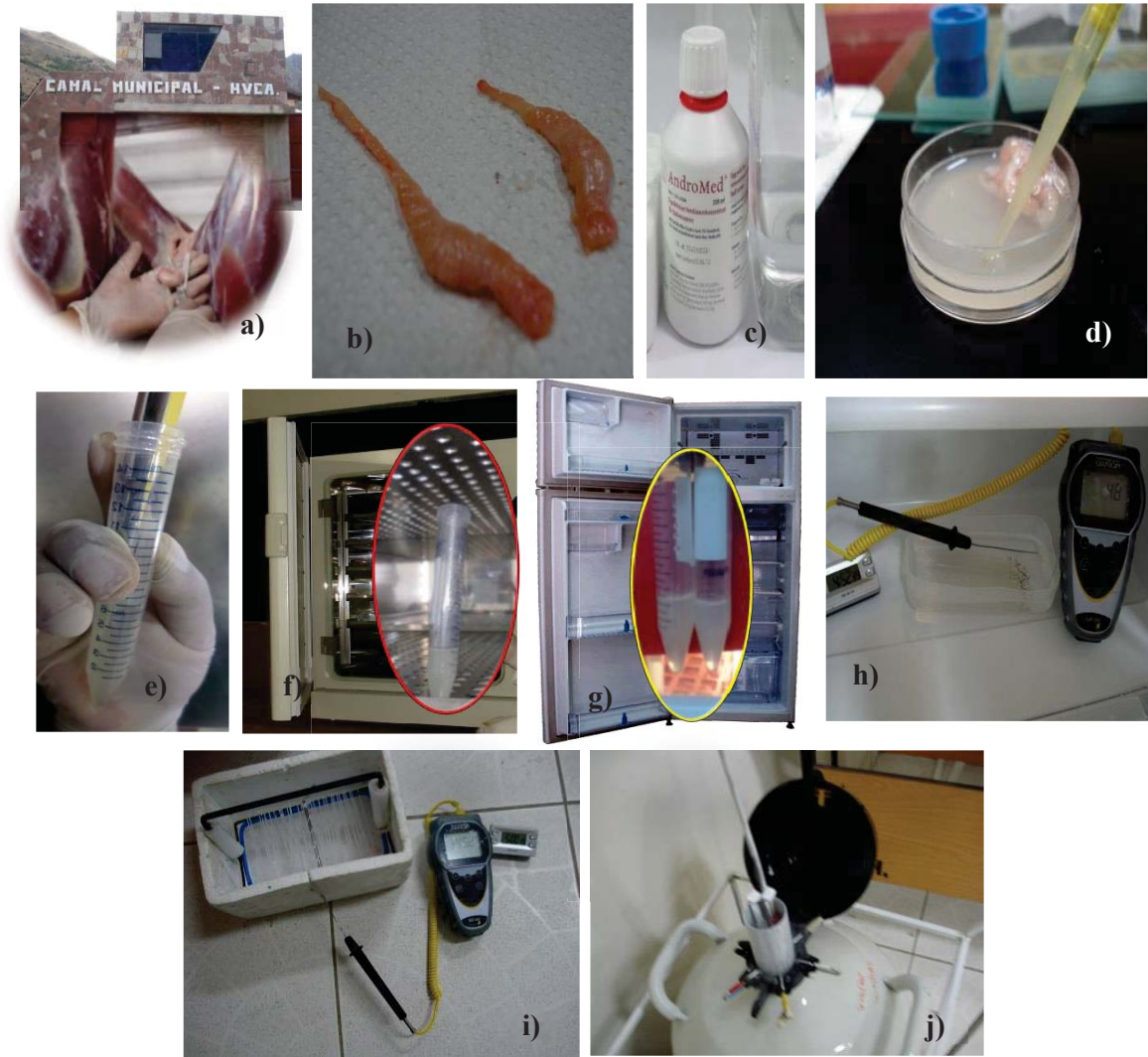


Figura 4: Secuencia de fotografías para obtención de espermatozoides congelados: a) Retiro de testículos de camal, b) aislamiento de cuerpo y cola de epidídimos, c) preparación de dilutor *AndroMed*®, d) aspiración de solución dilutor-espermatozoide (SOL) sobre platina a 37°C, e) SOL en tubo *Falcon*®, f) SOL en cámara CO₂, g) SOL en refrigeradora, h) pajillas con SOL en agua refrigerada a 5°C, i) congelado de pajillas en caja de tecnopor y j) pajillas almacenadas en tanque criogénico a -196°C.

La descongelación de semen, se realizó retirando las pajillas de las canastillas del tanque criogénico y trasladándolas a baño de agua a 37°C, por un tiempo de 15 segundos.

3.4 EVALUACIÓN DE CALIDAD ESPERMÁTICA

Durante el procesamiento de criopreservación de espermatozoides, las muestras consideradas aptas para su congelación debían tener una motilidad espermática superior a 60% durante la refrigeración. Asimismo, la calidad espermática de cada lote de congelación fue aprobada para su uso posterior cuando la motilidad fue superior a 15%.

Todas las operaciones de evaluación los realizó un solo operador, evaluando: (i) motilidad progresiva; (ii) vitalidad; y, (iii) concentración, siguiendo los procedimientos estándares recomendados por la Organización Mundial de la Salud en su manual; “*Laboratory manual for the examination and processing of human semen*” (WHO, 2010), que se describe a continuación.

Motilidad espermática

Sobre una platina temperada a 37°C se colocó 10 µl de espermatozoides en una lámina portaobjeto cubierta por un cubre objeto de 22 x 22 mm. Después de 60 segundos de reposo se le colocó sobre un microscopio de contraste de fase a 400 aumentos. El criterio de evaluación fue determinar el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, en al menos 10 campos de la muestra preparada.

Vitalidad espermática

Se colocó 10 µl de mezcla espermática y 10 µl de solución eosina al 5% más negrosina al 10%, que enseguida fue mezclada suavemente para luego realizar el frotis correspondiente y dejar secar al aire del ambiente. En un microscopio de contraste de fase a 400 aumentos se contabilizó un total de 200 células espermáticas, de ellas se calculó el porcentaje de espermatozoides vivos (espermatozoides negativos a la tinción de eosina).

Concentración espermática

Las muestras espermáticas post selección con método *washing* fueron diluidas con agua destilada en proporción de 1 en 100 (10 µl muestra en 990 µl de agua). Mientras que, las muestras espermáticas post selección con método *swim-up* fueron diluidas con agua destilada en proporción de 1 en 20 (10 µl muestra en 190 µl de agua). Se tomó una muestra de 10 µl de la mezcla y se colocó a cada lado de la cámara *Neubauer* previamente preparada. Un microscopio de contraste de fase a 400 aumentos, fue utilizado para el recuento espermático. El número total de espermatozoides por ml de la muestra se determinó multiplicando el conteo de espermatozoides totales de los 5 cuadrantes por la inversa de la tasa de dilución (1/100; 1/20) y factor 50 de la cámara *Neubauer*.

3.5 SELECCIÓN ESPERMÁTICA

El método *swim-up*

Se mezcló en un tubo cónico a temperatura ambiente de laboratorio (15 a 20°C), 1000 µl de solución *Tyrode's* modificado (medio *Sperm Talp*; 100 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 25.0 mM NaHCO₃, 0.3 mM NaH₂PO₄, 21.6 mM lactato de sodio, 2.0 mM CaCl₂(2H₂O), 0.4 mM MgCl₂(6H₂O), 10.0 mM HEPES), que en el día de uso fue suplementado con 1.0 mM piruvato de sodio, 6 mg/ml BSA fracción V y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (medio *Sperm Talp* suplementado) (Parrish *et al.*, 1988; Del Campo *et al.*, 1994; Ruiz y Correa, 2007)) con 100 µl de muestra espermática descongelada, siendo inmediatamente centrifugada a 3000 rpm x 5 minutos a temperatura de laboratorio. Al *pellet* formado al fondo del tubo se le adicionó 100 µl de solución *Tyrode's* modificado (medio *Fert Talp*; 114.0 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 25.0 mM NaHCO₃, 0.3 mM NaH₂PO₄, 10.0 mM lactato de sodio, 2.0 mM CaCl₂(2H₂O), 0.5 mM MgCl₂(6H₂O)) que al día de uso fue suplementado con 0.2mM piruvato de sodio, 6 mg/ml BSA libre de ácido graso y 50 µg/ml sulfato de gentamicina (medio de fecundación) (Parrish *et al.*, 1988; Del Campo *et al.*, 1994; Ruiz y Correa, 2007), siendo este nuevo volumen cuidadosamente inoculado al fondo de otro tubo cónico en 200 µl de medio de fecundación, la cual se dejó en incubación a 45° de inclinación durante 45-60 minutos en una cámara de CO₂, con la finalidad de permitir la

obtención de espermatozoides motiles en la parte superior de la mezcla. Se tomó una muestra de los espermatozoides que sobrenadaron a la superficie del medio de suspensión, evaluándose en ellos: (i) motilidad progresiva; (ii) vitalidad; y, (iii) concentración espermática, como previamente se describió; obteniendo 2.9×10^6 espermatozoides con motilidad progresiva/ml (Figura 5; Anexo 7b).

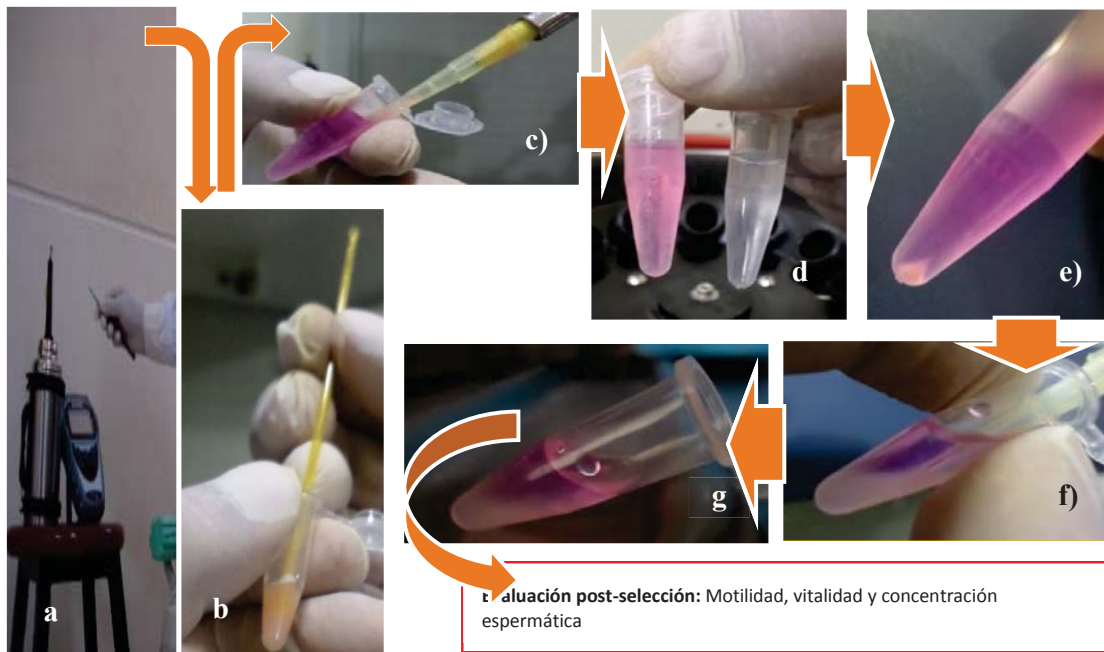


Figura 5: Representación del proceso de selección de espermatozoides descongelados de alpaca a través del método *swim-up*, para proceso IVF: a) Descongelado de pajilla ($37^{\circ}\text{C}/15$ seg.). b) Espermatozoides trasvasados a *vial* (0.5ml). c) Mezcla de espermatozoides con medio *Sperm Talp* suplementado. d) Centrifugado a 3000 rpm/5min. e) *Pellets* post-centrifugado (Eliminado sobrenadante). f) Inoculado de *pellets* disuelto, en medio de fecundación. g) Espermatozoides en medio de fecundación/45-60 min.

El método *washing*

Se mezcló, en un tubo cónico a temperatura ambiente de laboratorio, 1000 μ l de medio *Sperm Talp* suplementado con 100 μ l de muestra espermática descongelada, siendo inmediatamente centrifugada a 3000 rpm x 5 minutos. El pellet formado al fondo del tubo fue trasladado a otro tubo cónico adicionándole 1000 μ l de medio *Sperm Talp* suplementado y centrifugado por segunda vez durante 3 minutos a 3000 rpm. Finalmente, el *pellet* de espermatozoides obtenido después del segundo lavado se suspendió en 400 μ l de medio de fecundación y fue evaluado en su: (i) motilidad progresiva; (ii) vitalidad; y, (iii) concentración espermática, como anteriormente describimos; así se obtuvo un total de 11×10^6 espermatozoides con motilidad progresiva/ml (Figura 6; Anexo 7b).

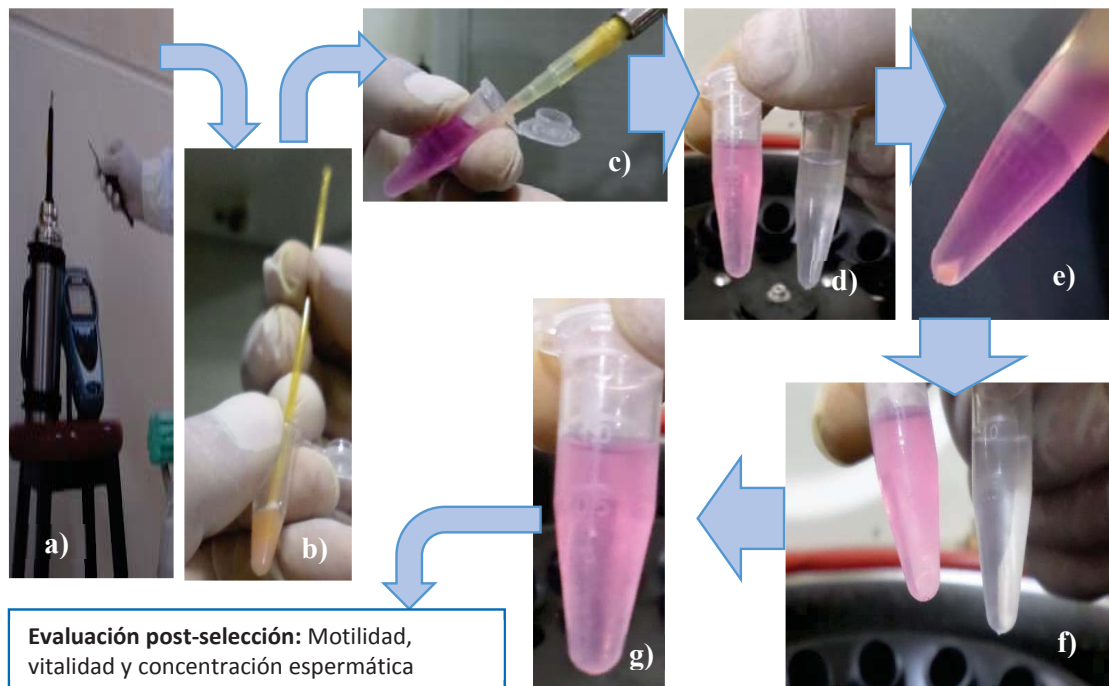


Figura 6: Representación del proceso de selección de espermatozoides descongelados de alpaca, a través del método *washing* para proceso IVF: a) Descongelado de pajilla (37°C/15 seg). b) Espermatozoides trasvasados a *vial* (0.5ml). c) Mezcla de espermatozoides en medio *Sperm Talp* suplementado. d) Centrifugado a 3000 rpm /5min. e) *Pellets* al 1^{er} post-centrifugado en *Sperm Talp* suplementado. f) Re-centrifugado (3000 rpm/3min) obteniendo 2^{do} *pellets* en medio de fecundación. g) Mezcla en medio de fecundación, lista para evaluación.

3.6 PROCESO DE FECUNDACION *IN VITRO*

El traslado de ovarios, desde el Matadero Municipal de Huancavelica al laboratorio se realizó en un recipiente isotérmico. Luego en laboratorio fueron lavados dos a tres veces con solución fisiológica al 0.9% de NaCl con 50 µg/ml de sulfato de gentamicina a 35 °C (3-4 horas post sacrificio/beneficio de alpacas), manteniéndolos en la misma solución durante el trabajo de aspiración. El líquido folicular se aspiró de folículos visibles (2 a 6 mm) en la superficie del ovario, utilizando una aguja hipodérmica de 21G de 1 ½ pulgada de largo, adosada a una jeringa estéril de 10 ml de capacidad.

El líquido folicular obtenido, fue vertido en una placa *petri* de 100 x 20 mm mezclándolo en *Tissue Culture Medium*-199 (TCM-199) con 2.2 g/l de NaHCO₃ y 5.94 g/l de HEPES (medio de maduración), que en el día de uso fue suplementado con 11 mg/l piruvato de sodio, 20 unidades/l de hormona foliculo-estimulante (FSH), 1mg/l de estradiol-17b, suero fetal bovino (*Sigma F-9423*) al 10% y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (Del Campo *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1997; Ruiz y Correa, 2007). Los COC se visualizaron y clasificaron bajo un microscopio estereoscópico entre 200 y 400 aumentos, respectivamente.

La clasificación morfológica de los COC se realizó en 4 categorías como indica De Loos *et al.*, (1989): (I) Ovocitos completamente rodeados por 3 a más capas de células del cumulus con citoplasma homogéneo, eventualmente granulado; (II) ovocitos rodeados con menos de 3 capas de células del cumulus y citoplasma generalmente homogéneo; (III) ovocitos desnudos y citoplasma con apariencia irregular con zonas oscuras; y, (IV) ovocitos con cumulus expandido y/o citoplasma irregular. Los COC se clasificaron como viables para IVF (calidad I y II) y no viables para IVF (calidad III y IV).

Para la maduración de los COC, al menos tres horas antes, se colocó en incubadora con 38.5°C de temperatura, 5% de CO₂ y aire con alta humedad, placas *petri* de 35 x 15 mm (*Falcon*®, 1008) preparadas con gotas de 50 µl de medio de maduración cubierto con aceite mineral (7 gotas/placa), con la finalidad de equilibrar la temperatura y pH de las gotas. En ninguno de los tratamientos se utilizó agente para capacitación de espermatozoides. Al momento de la maduración los COC viables fueron lavados 3 a 4

veces en medio de maduración y colocados en grupos de 10 por cada gota preparada para luego ser re-incubados por un lapso de 27 horas (Tanaka *et al.*, 1997; Del Campo *et al.*, 1994; Ruiz y Correa, 2007) (Figura 7).

Los COC madurados se sometieron a denudación parcial mediante pipeteo suave en la misma gota de maduración y lavado 2 a 3 veces en medio de fecundación, luego de ser distribuidos al azar en dos grupos, grupo *swim-up* y grupo *washing*, se transfirieron a gotas de fecundación de 45 μ l cubiertos con aceite mineral en placa *petri* de 35 x 15 mm. La placa de fecundación fue colocada en incubadora con 5% de CO₂, en aire con alta humedad y a 38.5°C de temperatura, mientras se realizaba la selección y capacitación espermática.

En la fecundación; de los espermatozoides obtenidos por el método *swim-up* (2.9×10^6 espermatozoides móviles/ml) en promedio se adicionó 11 μ l a las gotas de 45 μ l formando gotas de 56 μ l con una concentración final de 397×10^3 espermatozoides con motilidad progresiva/ml; y, para el caso de *washing*, de una concentración inicial de 11×10^6 espermatozoides con motilidad progresiva/ml se tomó en promedio 3 μ l para adicionar a las gotas de fecundación (45 μ l) haciendo gotas de 48 μ l con una concentración final de 484×10^3 espermatozoides con motilidad progresiva/ml (Figura 7; Anexo 7b).

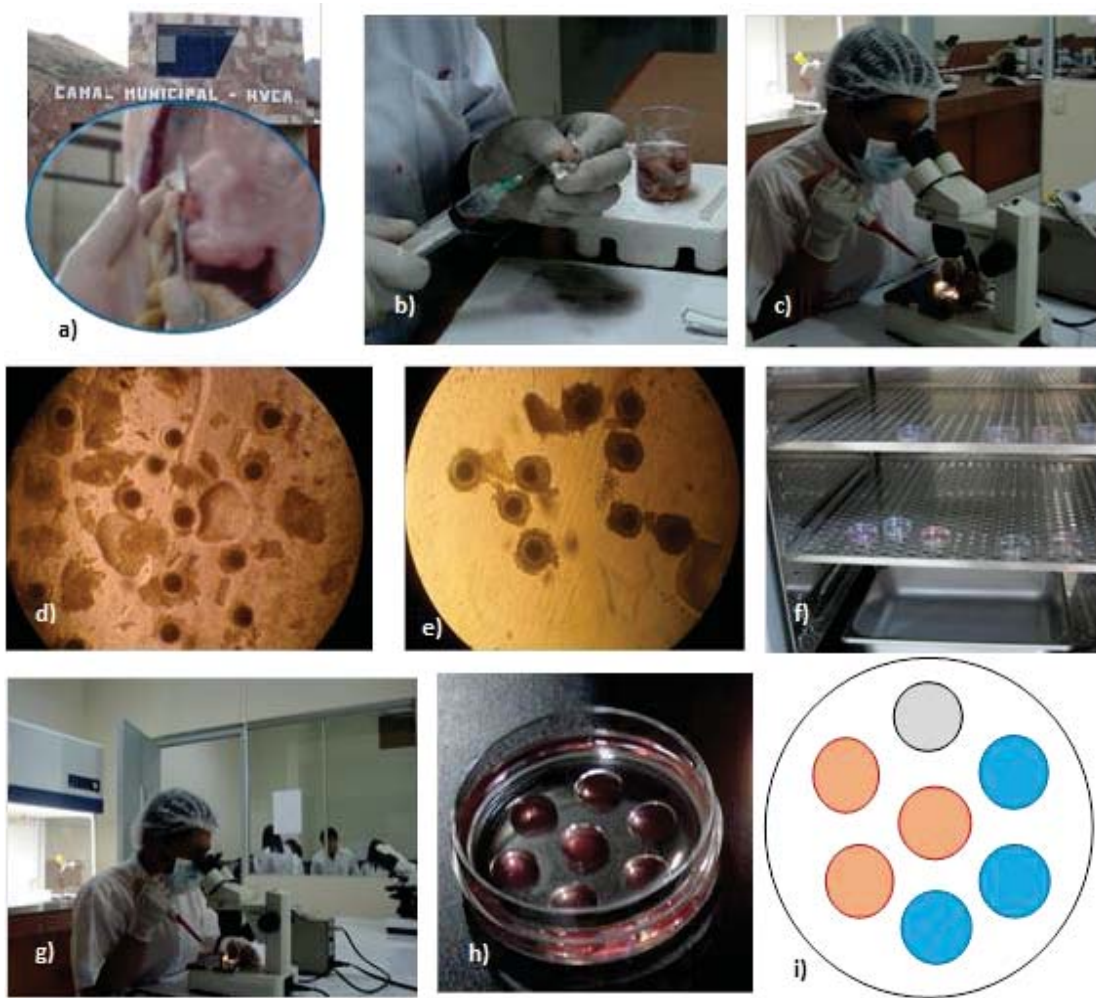


Figura 7: Proceso de fecundación *in vitro*: a) Disección de ovario en camal, b) aspiración de complejos cúmulos-ovocito (COC), c) evaluación y clasificación de COC, d) COC dispersos post aspiración, e) COC seleccionados para maduración *in vitro*, f) COC madurando en cámara de CO₂, g) fecundación de COC maduros, h) placa *petri* conteniendo medio de fecundación con COC expuestos a espermatozoides, i) esquema de las gotas en placa de fecundación: Gota color gris, para lavado de COC; gotas color rojo, COC expuestos a espermatozoides obtenidos por *swim-up* y gotas color azul, COC expuestos a espermatozoides obtenidos por *washing*.

3.7 EVALUACIÓN DE FECUNDACIÓN *IN VITRO*

Fue realizada a las 72 horas posteriores a la exposición de los ovocitos a los espermatozoides, utilizando un microscopio de contraste de fase invertido a 100 aumentos, evaluándose todos los ovocitos expuestos a los espermatozoides seleccionados por el método *swim-up* y *washing*. Los ovocitos divididos en dos o más células se consideraron embriones u ovocitos fecundados. La proporción de ovocitos divididos del total de fecundados, indica la tasa de fecundación. Todas las operaciones de evaluación fueron hechas por un mismo operador.

3.8 DISEÑO EXPERIMENTAL

Espermatozoides de epidídimos pertenecientes a 7 alpacas, fueron congeladas en pajillas de 0.25 ml (250 μ l); de estas se utilizaron 13 pajillas (una para cada sesión de IVF), que una vez descongelada y evaluada se tomó 100 μ l para realizar el método *swim-up* y 100 μ l para el método *washing*, y fueron procesados como se representa en la Figura 8.

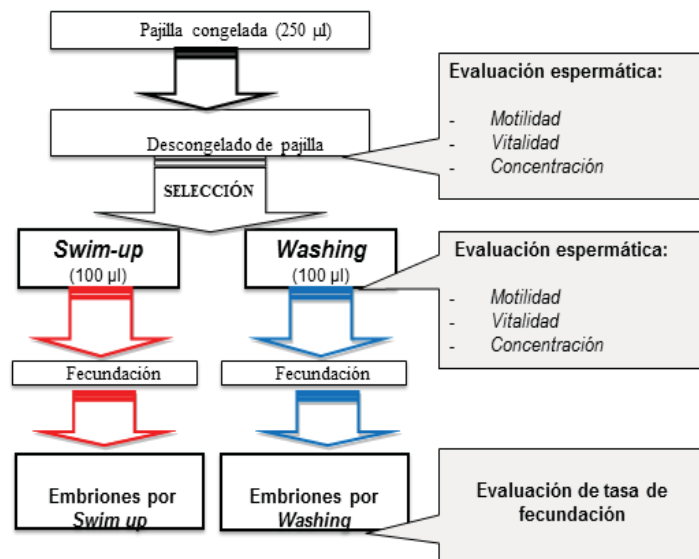


Figura 8: Diseño experimental de la aplicación de dos métodos de selección espermática *swim-up* y *washing*, en la tasa de fecundación de ovocitos de alpaca.

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A las variables respuesta; motilidad progresiva (%), vitalidad (%), concentración espermática y tasa de fecundación (%) se les aplicó estadística descriptiva. Los resultados que se expresan en porcentaje fueron convertidos a valores angulares (ángulo = arco seno $\sqrt{\text{porcentaje}}$) con el fin de acercar los datos a una distribución normal, como sugiere Steel Torrie (1985), previo al análisis ANVA.

Para evaluar el efecto de los métodos de selección espermática sobre las características espermáticas (motilidad progresiva, vitalidad y concentración) y tasa de fecundación, las variables respuesta de las 13 repeticiones fueron sometidas a un diseño completamente al azar con sub-muestra. Se utilizó la prueba estadística *Tukey*, para el análisis de medias de los métodos de selección espermática. El análisis estadístico fue realizado utilizando el paquete estadístico SAS versión 8.0 para Windows (1999-2001) por SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

El modelo aditivo lineal para el análisis de varianza es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + M_i + E_{ij} + e_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} : La respuesta al i -ésimo método de selección del j -ésimo epidídimo y k -ésima pajilla.

i = métodos de selección espermática *swim-up* y *washing*.

j = epidídimos (espermatozoides descongelados).

k = pajillas por epidídimos (medidas repetidas).

μ : La media general.

M_i : Efecto del i -ésimo método de selección espermática.

E_{ij} : Error asociado al j -ésimo epidídimo dentro del i -ésimo método de selección.

e_{ijk} : Error asociado a las pajillas dentro de la epidídimos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de los métodos de selección espermática *swim-up* y *washing* sobre las características espermáticas y las tasas de fecundación *in vitro* en ovocitos de alpacas.

4.1 CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS POST SELECCIÓN

Fueron utilizadas un total de 13 pajillas congeladas de 0.25 ml, pertenecientes a epidídimos de 7 alpacas adultas con cronología dentaria boca llena (5-7 años de edad) con desconocido historial reproductivo; las características de motilidad progresiva, vitalidad y concentración espermática se evaluaron inmediatamente después de la descongelación cuyos promedios y desviaciones estándar se muestran en la Tabla 2 y los detalles en los Anexos 5, 6, 7a y 7b.

Tabla 2: Características de espermatozoides de epidídimo de alpaca inmediato a la descongelación.

| Pajillas/0.25 ml (n) | Características evaluadas Promedio \pm DE | | |
|-------------------------|--|------------------|---------------------------------------|
| | Motilidad progresiva | Vitalidad | Concentración (x 10 ⁶ /ml) |
| 13 | 25 \pm 5.96% | 32.0 \pm 5.57% | 66.6 \pm 6.1 |

Los resultados de las características estudiadas posteriores a los métodos *swim-up* y *washing* en términos de promedios (\pm desviaciones estándar) y comparaciones entre ambos métodos se muestran en la Tabla 3 y los datos detallados en los Anexos 5, 6, 7a y 7b. No se encontró diferencia significativa entre los métodos *swim-up* y *washing* respecto a motilidad progresiva y vitalidad espermática ($p > 0,05$). Sin embargo, respecto a

concentración espermática, el método *washing* arrojó un valor estadísticamente superior ($52.0 \times 10^6/\text{ml}$) al obtenido por el método *swim-up* ($13.6 \times 10^6/\text{ml}$) (Figura 9).

Tabla 3: Características de espermatozoides descongelados, de epidídimo de alpaca, evaluados posterior a los métodos de selección *swim-up* y *washing*.

| Método de selección | (n) | Características evaluadas | | |
|---------------------|-----|---------------------------|---------------------|---|
| | | Promedio \pm DE | | |
| | | Motilidad progresiva | Vitalidad | Concentración ($\times 10^6/\text{ml}$) |
| <i>Swim-up</i> | 13 | $18 \pm 6.78\%_a$ | $22.0 \pm .58\%_a$ | $13.6 \pm 11.0_a$ |
| <i>Washing</i> | 13 | $23 \pm 4.83\%_a$ | $29.0 \pm 8.30\%_a$ | $52.0 \pm 28.3_b$ |

En las comparaciones verticales, letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$).

Estadísticamente, en términos de calidad de espermatozoides (motilidad progresiva y vitalidad), tanto el método *swim-up* y *washing* muestran resultados similares; sin embargo, existe un ligero menor número en el primer método probablemente porque su proceso implica un relativo largo periodo (alrededor de 80 a 100 minutos), produciendo estrés y alteración en los patrones de desplazamiento de los espermatozoides (Correa y Zavos, 1996), sumado a los daños causados por los procesos de congelación y descongelación que disminuyen tanto la viabilidad como la longevidad de las células espermáticas; de manera que, una separación en corto tiempo como el método *washing* (proceso de alrededor de 40 a 50 minutos) es deseable, pues además es de fácil realización, implica menor costo económico, y su factibilidad de alcanzar altas tasas de recuperación espermática (Beck y Silverstein, 1975; Drobnis *et al.*, 1991; Zavos, 1992; Avery y Greve, 1995) pero, este método, al utilizar una doble centrifugación, pudo haber causado daño a la membrana plasmática celular induciendo a la acumulación excesiva de ROS que combinado a las pequeñas cantidades de enzimas antioxidantes en el pequeño tamaño del citoplasma espermático, dañan irreversiblemente sus componentes (DNA, proteínas y lípidos), consecuentemente su motilidad, viabilidad y habilidad fecundante especialmente en alpacas (Santiani, 2012) así como en bovinos y en humanos (Aitken *et al.*, 1987; Aitken y Clarckson, 1988; Conrad *et al.*, 2015; Brogan *et al.*, 2015).

En cuanto al porcentaje de espermatozoides viables (vitalidad) estos siempre exceden al porcentaje de espermatozoides móviles pues existe un conjunto de espermatozoides que a pesar de no poseer movilidad muestran membranas plasmáticas intactas, los denominados espermatozoides viables no móviles, que están desestabilizadas sin llegar a la muerte (Drobnis *et al.*, 1991; Santiani, 2012).

Respecto a la concentración o densidad de espermatozoides recuperados post-selección, la técnica *washing* recupera mayor cantidad de espermatozoides, 78.2% del número total de espermatozoides sujetos a selección (52.0/66.5 (x 10⁶/ml)), que podría atribuirse en gran medida al hecho de que este método tiende a conglomerar todo tipo de partículas (espermatozoides, restos celulares y leucocitos) que tiene un peso al fondo del tubo, sin diferenciar adecuadamente los espermatozoides de mayor motilidad, viabilidad e integridad de ADN (Morrell y Rodríguez-Martínez, 2009). Mientras el método *swim-up*, en promedio, logró recuperar solo el 20.4% de la muestra inicial (13.5/66.5 (x 10⁶/ml)), que es similar al 10 a 20% de espermatozoides recuperados en vacunos (Zang *et al.*, 1998); otra explicación probable, a esta baja tasa de recuperación es la ocurrencia de capacitación espermática (evento irreversible), que con un tiempo prolongado y sobretodo en ausencia de ovocitos, llevan al agotamiento y muerte de los espermatozoides, evitando que naden a la superficie del medio de donde debieran ser recuperados (Hallap *et al.*, 2004; Rodríguez-Martínez, 2001). En camélidos sudamericanos, hasta la fecha no encontramos trabajos científicos que determinen las características de calidad espermática post selección para su uso en procedimientos IVF, que permitan contrastar estos resultados.

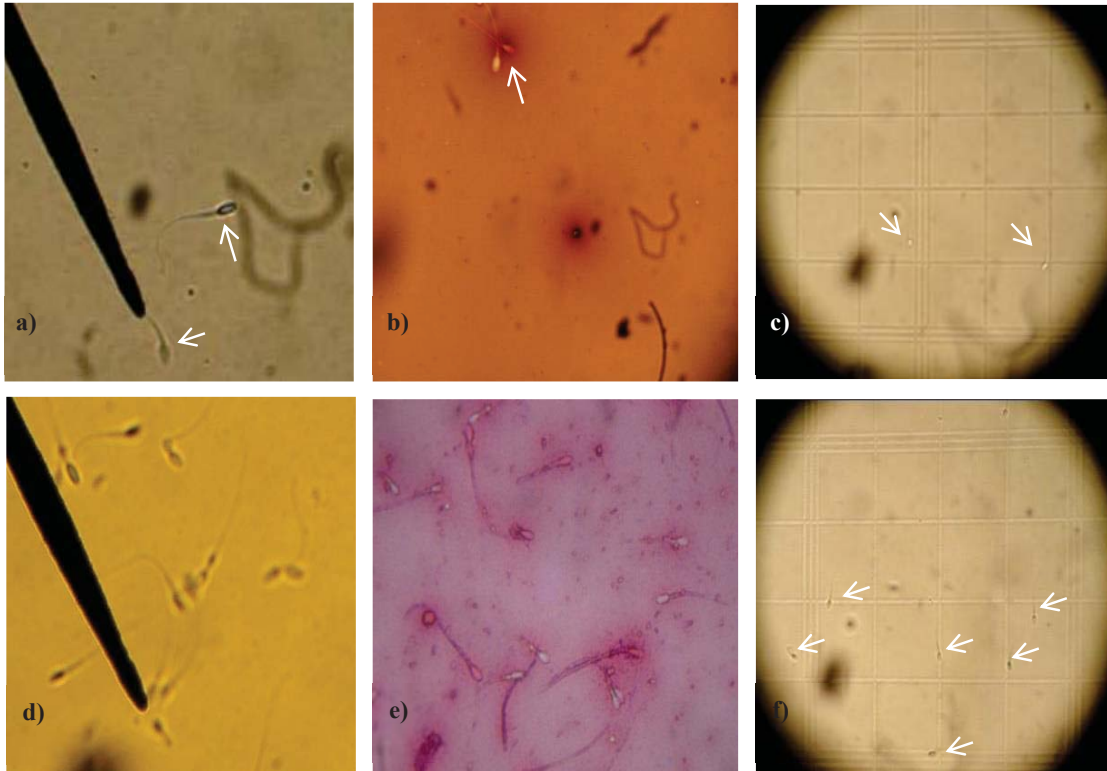


Figura 9: Características de espermatozoides descongelados de alpaca posterior a selección: *Swim-up* en fila superior; a) Motilidad espermática progresiva de dos espermatozoides, b) flecha indica 1 esperma muerto (cabeza roja) y 1 vivo (cabeza clara), c) 2 espermatozoides en cámara *Neubauer* indicados por flechas. *Washing* en fila inferior; d) Motilidad de varios espermatozoides, e) espermatozoides muertos (cabezas rojas) y vivos (cabezas claras) y, f) flechas indican espermatozoides en cámara *Neubauer*. Nótese la diferencia, menor cantidad espermática en fila superior (*swim-up*) y mayor cantidad espermática en fila inferior (*washing*).

4.2. EVALUACIÓN DE TASA DE FECUNDACIÓN

De un total de 168 alpacas de entre 1.5 a 7 años de edad sin historial reproductivo, 335 ovarios fueron utilizados logrando recuperar 839 COC viables para el proceso de fecundación *in vitro*. El número promedio de COC viables recuperados de cada ovario fue de 2.5, siendo este valor similar a los valores reportados por Del Campo *et al.*, (1992) con 3.2 COC por ovario de llama y Ruiz *et al.* (2007) con 2.2 COC por ovario de alpaca.

La tasa de fecundación resultante de este trabajo, fue verificada a través de la observación de escisión o división de ovocitos (*cleavage*) a las 72 horas post-exposición *in vitro* a espermatozoides seleccionados por los métodos *swim-up* y *washing*; los resultados en promedios y desviaciones estándar se muestran en la Tabla 4 y los datos en detalle en el Anexo 8 (Figura 10).

Tabla 4: Tasa de fecundación *in vitro* (IVF) de ovocitos de alpaca, utilizando espermatozoides descongelados de epidídimo seleccionados mediante los métodos *swim-up* y *washing*.

| Método de selección | Nº Sesión IVF | COC ¹ (n) | Ovocitos fecundados ² | Tasa de fecundación (%) |
|---------------------|---------------|----------------------|----------------------------------|-------------------------|
| <i>Swim-up</i> | 13 | 418 | 147 | 35.17 _a |
| <i>Washing</i> | 13 | 421 | 155 | 36.82 _a |

¹ COC (*complejos cumulus-ovocito*) expuestos a espermatozoides para fecundación.

² Ovocitos divididos (*cleavage*), considerados fecundos.

En comparaciones verticales, letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$).

No se encontró diferencia significativa entre ambos métodos estudiados ($p > 0,05$); Estas tasas de fecundación de 35.17% para el método *swim-up* y 36.82% para *washing*, son superiores a los reportados por Gamarra *et al.* (2008), quienes también utilizando espermatozoides congelados, pero en *pellets*, lograron 27.1% de *cleavage*, lo que podríamos atribuir al efecto perjudicial toxico ejercido por la polivinilpirrolidona libre del método *percoll* utilizado para selección de los espermatozoides recuperados, disminuyendo la penetración espermática al ovocito y así bajar la tasa de fecundación (Henkel y Schill, 2003; Keefer y Paprocki, 1995; Avery y Grave, 1995), sumado a ello la utilización de una menor población de COC (262) respecto al presente estudio (839).

Sin embargo, nuestros resultados son menores a los reportados con espermatozoides frescos: en alpacas, 36% y 43.9% (Mendoza *et al.*, 2008) y 40.8% (Conde *et al.*, 2008); y, en llamas, 65.3% (Berland *et al.*, 2011); inferioridad debida al efecto negativo irreversible del transcurrir del tiempo post-obtención de las células espermáticas incrementado aún más, por el proceso de congelación y descongelación sobre la viabilidad espermática, reduciendo su motilidad y habilidad fecundante, considerando que las células espermáticas

de alpacas muestran un alto grado de susceptibilidad al proceso de criopreservación (Santiani *et al.*, 2005) y, en general de similar forma que en otras especies, solo alrededor de 40-50% de los espermatozoides sobreviven al proceso de criopreservación aun usando protocolos óptimos (Watson, 2000; Aurich, 2005; Morton *et al.*, 2007 y 2010; Medeiros *et al.*, 2002).

En este trabajo se llegó hasta evaluar solamente tasas de *cleavage* considerando que; en condiciones *in vitro*, esta tasa es la más adecuada para la evaluación de muestras espermáticas, que la tasa de blastocisto, debido a que estos últimos son más dependientes de las condiciones de cultivo durante el desarrollo embrionario que el estado de *cleavage* (Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000); de acuerdo a nuestros resultados, ambos métodos ofrecen similares tasas de *cleavage*, pues al parecer ninguno de los métodos estudiados tuvo efectos perjudiciales sobre la tasa de fecundación, hecho que se asemeja a los reportes para bovinos (Avery y Greve, 1995; Dode *et al.*, 2002).

Observamos también la presencia de algunos embriones en estado de cuatro células y mórulas entre los ovocitos madurados, similares casos se reportan para llamas y camellos dromedarios por razones hasta ahora aún desconocidas, pues aparentemente los ovocitos de camélidos poseen la habilidad para la activación partenogenética espontánea natural, que se desarrollan dentro de los folículos ováricos (Del campo *et al.*, 1994; Abdoon *et al.*, 2007; Wani y Skidmore, 2010).

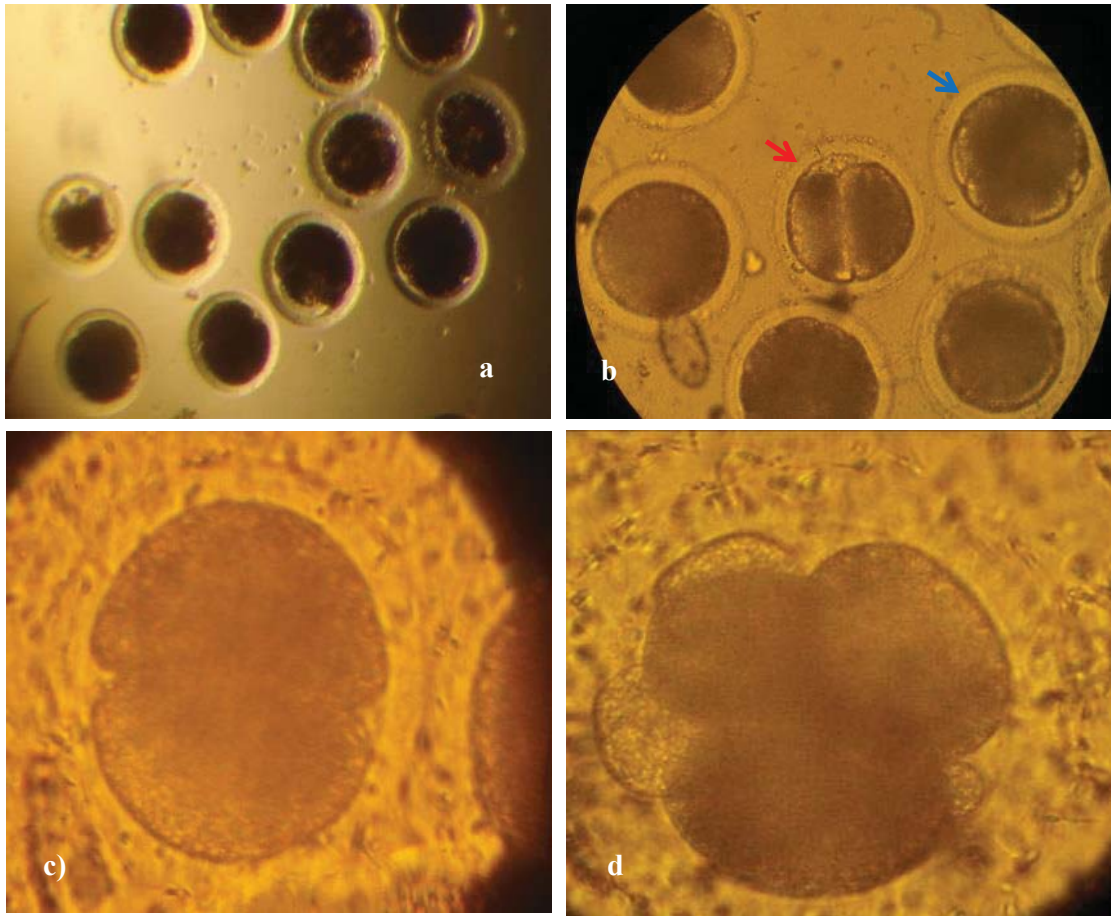


Figura 10: Tasas de fecundación *in vitro* en fotografías: a) población de embriones y ovocitos no fertilizados, b) embriones en estado de *cleavage*, flecha roja (dos células) flecha azul (4 células), c) embrión de dos células, d) embrión de 4 células.

V. CONCLUSIONES

5.1 Ambos métodos, *swim-up* y *washing*, pueden ser usados para preparar muestras espermáticas de epidídimo de alpacas en procesos de fecundación *in vitro* sin perjudicar la tasa de fecundación.

5.5 Tanto el método *swim-up* como *washing*, mostraron similares resultados en porcentaje de espermatozoides viables y móviles, sin embargo, el método *washing* recuperó una cantidad superior (78.2%) al método el *swim-up* (20.4%).

VI. RECOMENDACIÓN

- 6.1 Utilizar el método *washing* para optimizar la tasa de recuperación de espermatozoides del epidídimo y su posterior utilización en la IVF.
- 6.2 Determinar la influencia de la producción de especies oxígeno reactivas (ROS) por los métodos selección espermática *swim-up* y *washing* de muestras frescas y congeladas, sobre la unión espermatozoide-ovocito y posterior desarrollo de embriones *in vitro* de alpacas.
- 6.3 Evaluar el tiempo óptimo de exposición de ovocitos a espermatozoides frescos y congelados para alcanzar adecuadas tasas en la producción de embriones *in vitro* de alpacas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdoon ASS, Kandil OM, Berisha B, Kliem H, Schams D. 2007. Morphology of dromedary camel oocytes and their ability to spontaneous and chemical parthenogenetic activation. *Reprod Domest Anim* 2007; 42: 88 –93.

Adams GP, Sumar J, Ginther OJ. 1990. Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *J. Reprod. Fert.* 90, 535–545.

Ángel D, Pérez N, Pareja A, Camargo O, Urrego R. 2009. Efecto de la preparación espermática previo a la fertilización *in vitro* sobre la membrana plasmática y el ADN de semen bovino sexado. *Revista CES. Medicina Veterinaria y Zootecnia.* 4 (2): p1900-9607.

Aitken R, Clarkson J. 1987. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fert* 81:459-469.

Aitken RJ, Clarkson JS. 1988. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J. Androl* 1988; 9:367-376.

Albers M, Barrios D. 2006. Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros *post mortem* obtenidos mediante lavado retrógrado. *Zootecnia Tropical.* 3(24): p267-280.

Amann RP, Schanbacher BD. 1983. Physiology of male reproduction. *Journal Animal Science.* 2(57): p380-403.

Aurich C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2005; 89: 65-75.

Avery B, Greve T. 1995. Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology* 44, 871–878.

Beck WW, Silverstein I. 1975. Variable motility recovery of spermatozoa following freeze preservation. *Fertil Steril* 1975; 26: 863-867.

Berland MA, Von Baer A, Ruiz J, Parraguez V, Morales P, Adams GP, Ratto, M.H. 2011. *In vitro* fertilization and development of cumulus oocyte complexes collected by ultrasound-guided follicular aspiration in super stimulated llamas. *Theriogenology* 75, 1482–1488.

Binelli M, Murphy BD. 2010. Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 22, no. 1, pp. 1–12, 2010.

Björndahl L, Mohammadiel M, Pourian M, Söderlund I, Kvist U. 2005. Contamination by seminal plasma factors during sperm selection. *J Androl* 2005; 26: 170-3.

Blash S, Melican D, Gavin, W. 2000. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology* 54: p899–905.

Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA. 2002. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod* 66:38-43.

Bowles J, Koopman P. 2010. Sex determination in mammalian germ cells: extrinsic versus intrinsic factors, *Reproduction* 139 (2010) 943–958.

Bravo W, Sumar J. 1989. Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. *Animal Reproduction Science*. **21**: 271-281.

Bravo PW, Skidmore JA, Zhao XX. 2000. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Animal Reproduction Science* 2000; 62: 173–93.

Bravo WM, Correa J, Ruiz J. 2011. El ciclo ovárico de los camélidos sudamericanos. En: Ruiz J. 2011. *Producción y tecnología en camélidos sudamericanos*. Talleres Gráficos Universidad Nacional de Huancavelica. p203-222.

Bravo W, Alarcon V, Baca L, Cuba Y, Ordoñez C, Salinas J, Tito F. 2013. Semen preservation and artificial insemination in domesticated South American camelids. *Animal Reproduction Science* 136 (2013)157-163.

Braw-Tal R. 2002. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? *Molecular and Cellular Endocrinology*. 22,187,11-18.

Brito LFC. 2007. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice* 6, 249-264.

Brogliatti G, Palasz A, Rodriguez-Martinez H, Mapletoft RJ, Adams GP. 2000. Transvaginal collection and ultrastructural of llama (*Lama glama*) oocytes. *Theriogenol*. 54:1269 –79.

Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. 1990. Interactions between Somatic Cells and Germ Cells throughout Mammalian Oogenesis. *Biology of Reproduction* 43, 543-547 (1990).

Conde PA, Herrera C, Trasorras VL, Giuliano S, Director A, Miragaya MH, Cháves MG, Sarchi MI, Stivale D, Quintans C, Agüero CA, Rutter B, Pasqualini S. 2008. In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Animal Reproduction Science*. Volume 109, Issue 1 , Pages 298-308.

Condori RL, Huanca W, Chileno M, Cainzo J, Valverde F, Becerra JJ, Quintela LA, Herradon PG. 2010. Effect of follicle-stimulating hormone addition on in vitro maturation and cleavage of alpaca (*Vicugna pacos*) embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 23, 224.

Conrad M, Ingold I, Buday K, Kobayashi S, Angeli JPF. 2015. ROS, thiols and thiol-regulating systems in male gametogenesis. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gen. Subj.*

Correa JR, Zavos PM. 1996. Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. *Theriogenology* 46, 1225-1232.

Chauhan M, Nadir S, Bailey T, Pryor A, Butler S, Notter D, Velandar W, Gwazdauskas F. 1999. Bovine follicular dynamics, oocyte recovery, and development of oocytes microinjected with a green fluorescent protein construct. *Journal of Dairy Science.* 82: p918–926.

Chen MJ, Bongso. 1999. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. *Human Reproduction.* 14, 759-764.

Chenoweth P. 1997. Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull. Youngquist, R.S. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology.* Saunders. p217- 229.

De Loos F, Van Maurik P, Van Beneden T, Kruip TAM. 1992. Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development,* vol. 31, N° 3, pp. 208–214, 1992.

De Loos F, Van Vliet C, Van Maurik P, Kruip AMT. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res.* 24(2): 197–204 (Abstract).

Del Campo MR, Donoso MX, Del Campo CH. 1992. In vitro maturation of Llama (*Lama glama*) oocytes. *Proc 12th Int Congress Animal Reproduction.* 1: p 324.

Del Campo MR, Del Campo CH, Donoso MX, Berland M, Mapletoft RJ. 1994. In vitro fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology*. 41(6): p1219-29.

Dode MAN, Rodovhalo NC, Ueno VG, Fernandez CE. 2002. The effect of sperm preparation and co-Incubation time on in vitro fertilization of *Bos indicus* oocytes. *Animal Reproduction Science*. 69: p15-23.

Dresdner RD, Katz, DF. 1981. Relationships of mammalian sperm motility and morphology to hydrodynamic aspects of cell function. *Biol Reprod*. 25, 920-930.

Drobnis EZ, Zhong CQ, Overstreet JW. 1991. Separation of cryopreserved human semen using Sephadex columns, washing, or percoll gradients. *J. Androl* 1991; 12:201-208.

Duszevska AM, Rapala L, Trzeciak S, Dabrowski S, Piliszek A. 2012. Obtaining farm animal embryos *in vitro*. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 21, 2012, 217-233.

Durinzi KL, Saniga EM, Lanzendorf SE. 1995. The relationship between size and maturation in vitro in the unstimulated human oocyte, *Fertil. Steril*. 63 (1995) 404–406.

Eppig JJ. 1996. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev*. 1996;8(4):485-9.

Eugster A, Vingerhoets AJJM. 1999. Psychological aspects of in vitro fertilization: a review. *Social Science & Medicine* 48 (1999) 575-589.

Foote RH, Igboeli G. 1968. Maturation changes in bull epididymal spermatozoa. *Journal Dairy Science*. 10: p1703–1705.

Fortune JE. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. 78,135-163.

Gago C, Pérez-Sánchez F, Yeung CH, Tablado L, Cooper TG, Soler C. 1999. Morphological characterization of ejaculated cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm. American Journal of Primatology 47, 105-115

Gamarra G, Gallegos A, Alvarado E, Asparrin M, Vivanco W. 2007. Techniques for ovum pick-up in gonadotropin-treated alpacas. Reproduction, Fertility and Development. 20: p159–160.

Gamarra G, Gallegos A, Alvarado E, Asparrin M, Vivanco W. 2008. First in vitro embryo production in alpacas (*Lama pacos*). Reproduction, Fertility and Development. 21, 177–178.

Gigli I, Russo A, Agüero A. 2006. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. In Vet. 2006, 8(1): 183-204.

Giuliano S, Miragaya M. 2011. Biotecnologías aplicadas en el macho de camélidos sudamericanos. En: Ruiz J. 2011. Producción y tecnología en camélidos sudamericanos. Primera edición. Talleres Gráficos Universidad Nacional de Huancavelica. p141-167.

Gómez C, Ratto MH, Berland M, Wolter M, Adams GP. 2002. Super stimulatory response and oocyte collection in Alpacas. Theriogenology 57: p584.

Gonzales H, Dávalos R, Moina M, Mellisho E. 2008. Obtención y crioconservación de espermatozoides de alpacas. Scientia. 10 (10).

Gordon I, LU H. 1990. Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. Theriogenology. 33: p77-87.

Gordon I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. In CAB International (ed). Biotechnology in Agriculture. (11):640p.

Gravance CG, Vishwanath R, Pitt C, Garner DL, Casey PJ. 1998. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *Journal of Andrology* 19, 704-709

Hafez ESE, Hafez H. 2000. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ed. México. McGraw-Hill Interamericana. p 441.

Hallap T, Haard M, Jaakma U, Larsson L, Rodriguez-Martinez E. 2004. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility. *Theriogenology*. Volume 62, Issue 3, Pages 702-713, August 2004.

Hammadeh ME, Al Hassani S, Rosenbaum, P, Schmidt W, Fischer HC. 2008. Reactive oxygen species, total anti-oxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ICSI patients. *Arch Gynecol Obstet* 2008; 277: 515-26.

Handel MA, Schimenti JC. 2010. Genetics of mammalian meiosis: Regulation, dynamics and impact on fertility. *Nature Reviews Genetics* 11, 124-136.

Henkel RR, Schill W. 2003. Sperm preparation for ART. Review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2003, 1:108.

Hidalgo M, Rodriguez I, Dorado J, Sanz J, Soler C. 2005. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Veterinary Medicine* 50, 24-32.

Hillier S, Smits J, Eichenlaub-Ritter U. 2010. Folliculogenesis and oogenesis: from basic science to the clinic. *Molecular Human Reproduction*, Vol.16, No.9 pp. 617–620, 2010.

Hirshfield AN. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Intern Rev Cytol* 1991; 124:43–101.

Hunter RHF, Rodriguez-Martinez H. 2004. Capacitation of mammalian spermatozoa *in vivo*, with a specific focus on events in the fallopian tubes. *Mol Reprod Dev.* 2004Feb, 67(2): 243-50.

Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47:23-32.

Huanca W, Cordero A, Huanca T, Adams G. 2007. Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos: Avances y perspectivas. *Archivo Latinoamericano de Producción Animal.* 15(Supl 1).

Huanca W, Ratto M, Vasquez M, Cervantes M, Cordero A, Enciso M, Huanca T, Adams G. 2006. Fertilización *in vitro* en camélidos, I: Recuperación de ovocitos vía transvaginal. *Memorias de la XXIX Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal.* Universidad Nacional del Perú. Huancayo.

Hunt PA, Hassold TJ. 2008. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends Genet* 24 (2008) 86–93.

Hurk R, Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63 (2005) 1717–1751.

Jasko DJ, Lein DH, Foote RH. 1990. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 197, 389-394.

Kaabi M, Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Rouissi H, Herraez, P, Anel L. 2003. Effect of epididymus handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology.* 60: p1249–1259.

Keefer CL, Paprocki AM. 1995. Effect of Percoll Following Sperm Separation on in Vitro Fertilization of Bovine Oocytes. *Theriogenology* 1995; 43: 244 (Abstract).

Kochhar HS, Kochhar KP, Basrur PK, King WA. 2003. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of *in vitro* produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science*. 77: p33-49.

Kohli J, Hartsuiker E. 2001. Meiosis. *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing Group.

Kordan W, Hoody D, Eriksson B, Fraser L, Rodriguez-Martinez H, Strzezek J. 1998. Sperm motility inhibiting factor (SMIF) - a plasmatic peptide with multifunctional biochemical effects on boar spermatozoa. *Reproduction Domestic Animal* 1998; 33: 347-54.

Larsson B, Rodriguez-Martinez H. 2000. Can we use in vitro fertilization tests to predict fertility? *Animal Reproduction Science* 60–61, 327–336.

Lessley BA, Garner DL. 1983. Isolation of motiles spermatozoa by density gradient centrifugation in percoll. *Gamete Res*. 7: p49-65.

Lewis S, Sterling E, Young I, Thompson W. 1997. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 67:142-147.

Love C, Varner D, Thompson J. 2000. Intra- and inter-stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. *J Reprod Fertil Suppl* (56), 93-100.

Marks S, Dupuis J, Mickelsen D, Memon M, Platz C. 1994. Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. *Journal. Animal Veterinary. Medic Association*. 205: p1639–1640.

Maxwell WMC.1996. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development* 8, 1165-1178.

Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. 2002. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology* 57:327-344.

Mendoza J, Ayuque A, Triviño F, Ayuque G, Yaranga M, Landeo L, Artica M, Ruiz J. 2008. Evaluación de dos métodos de separación de espermatozoides epididimarios para la fecundación *in vitro* de ovocitos de alpaca. XXXI Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal-APPA 2008. UNALM-Lima 15 al 18 de Octubre, 2008.

Miragaya MH, Chaves MG, Capdevielle EF, Ferrer MS, Pinto M, Rutter B, Neild DM, Agüero A. 2002. In vitro maturation of llama (*Lama glama*) oocytes obtained surgically using follicle aspiration. *Theriogenology* 57 (1): p731.

Mocé E, Graham JK. 2008. In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science* 105, 104-118.

Moniruzzaman M, Miyano T. 2010. Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals. *Journal of Reproduction and Development*. 56,559-566.

Morrell JM, Rodriguez-Martinez H. 2009. Biomimetic Techniques for Improving Sperm Quality in Animal Breeding: A Review. *The Open Andrology Journal*, 2009, 1, 1-9.

Morris L, Tiplady C, Allen WR. 2002. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology*. 58: p643–646.

Morte MI Rodrigues AM Soares D, Rodrigues AS, Gamboa S, Ramalho-Santos J. 2008. The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal

plasma: seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. *Animal Reproduction Science* 2008; 106: 36-47.

Mortimer D. 2000. Sperm preparation methods. *Journal of Andrology* 2000; 21: 357-66.

Mortimer S. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction. Update.* 3(5): p403-439.

Morton K, Bathgate R, Evans G, Maxwell W. 2007. Cryopreservation of epididymal alpaca sperm: a comparison of citrate- Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reproduction, Fertility and Development.* 19(7):792-796.

Morton K, Evans G, Maxwell W. 2010. Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology* 74:311-316.

Muiño R. 2008. Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: Identificación de subpoblaciones espermáticas. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. España. p10.

Muiño R, Rivera MM, Rigau T, Rodriguez-Gil JE, Peña AI. 2008. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Animal Reproduction Science* 109, 50-64.

Novoa C, Leyva V. 1996. Reproducción en alpacas y llamas. Fondo Contravalor Perú-Suiza, CISA/IVITA, Facultad Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Serie Publicación IVITA N°26), 30 p.

Novoa C, Franco E, García W, Pezo D. 1999. Dosis de Gonadotropinas (eCG y hCG), superovulación y obtención de embriones en alpacas. RIVEP. Perú 10 (1):48-53.

Oktem O, Oktay K. 2008. Stem cells: a perspective on oocytes. Annals of the New York Academy of Sciences. 1127,20-26.

Palma G. 2001. Biotecnología de la Reproducción. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. Pp. 225-282.

Palma GA, Argañaraz ME, Barrera AD, Rodler D, Mutto AA, Sinowatz F. 2012. Biology and biotechnology of follicle development. The Scientific World Journal Volume 2012, Article ID 938138, 14 p.

Parrish JJ, Parrish JL, First NL. 1984. Effect of *swin-up* separation and heparin pretreatment of frozen thawed spermatozoa on in vitro fertilization of bovine oocytes. Biology Reproduction. 30 (Suppl 1): p112.

Parrish JJ, Susko-Prurish J, Winer MA, First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol. Reprod 1988; 38:1171-1180.

Parrish JJ, Krogenas A, Susko-Parrish L. 1995. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. Theriogenology. 44: p859-869.

Pauffler SK, Foote, RH. 1968. Morphology, motility and fertility of spermatozoa recovered from different areas of ligated rabbit epididymides. *Journal. Reproduction Fertility*. 17: p125–137.

Pepling ME. 2006. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development, *Genesis* 44 (2006) 622–632.

Pérez-Llano B, Yenes-García P, García-Casado P. 2003. Four subpopulations of boar spermatozoa defined according to their response to the short hypoosmotic swelling test and acrosome status during incubation at 37°C. *Theriogenology* 60, 1401-1407.

Perez-Pé, R, Cebrian-Perez A, Muino Blanco T. 2001. Semen plasma proteins prevent coldshock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology* 2001; 56: 425-34.

Pinart E, Sancho S, Briz MD, Bonet S, García N. 1999. Characterization of the semen quality of postpuberal boars with spontaneous unilateral abdominal cryptorchidism on the right side. *Animal Reproduction Science* 55, 269-278.

Quintero A. 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. España. p10.

Quintero-Moreno A, Miro J, Teresa Rigau A, Rodríguez-Gil JE. 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 59, 1973-1990.

Ramalho-Santos J, Amaral A, Sousa AP, Rodrigues AS, Martins L, Baptista M, Mota PC, Tavares R, Amaral A, Gamboa S. 2007. Probing the structure and function of mammalian sperm using optical and fluorescence microscopy. *Modern Research and Educational*

Topics in Microscopy. Center for Neuroscience and Cell Biology, Department of Zoology, University of Coimbra 3004-517 Coimbra, Portugal.

Ratto MH, Wolter M, Gomez C, Berland M, Adams GP. 1999. In vitro maturation of llama oocytes. In: Proceedings of the II Congreso Mundial sobre Camélidos, Cuzco, Perú.

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

Ratto M. 2005. Ovarian follicular synchronization, ovulation and oocyte development in llamas and alpacas. Thesis PhD. Department of Veterinary Biomedical Sciences, WCVM University of Saskatchewan. Saskatoon, Saskatchewan S7N 5B4, Canada. 168p.

Ratto M, Gómez C, Berland M, Adams G. 2007. Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Animal Reproduction Science* 97: p246-256.

Roca J, Rodriguez MJ, Gil MA, Carvajal G, Garcia EM, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA. 2005. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *Journal Andrology* 2005; 26: 15-24.

Robaire B, Hermo L. 1988. Efferent ducts, epididymis and vas deferens: Structure functions and their regulation. In Knobil E. y J. Neill. (ed) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York. p 999-1080.

Robaire B, Viger R. 1995. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biology Reproduction*. 52: p226-236.

Rodriguez-Martínez H, Larsson B, Pertoft H. 1997. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reproduction Fertility Development*. 9: p297-308.

Rodriguez-Martinez H. 2001. Oviduct function in cows and pigs: with special reference to sperm capacitation. *Asian-Austr J Anim Sci* 2001; 14: 28–37.

Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren M Roca J, Peña FJ. 2008. Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 70 (2008) 1242–1250.

Roy SK, Greenwald GS. 1989. Hormonal requirements for the growth and differentiation of hamster pre-antral follicles in long-term culture, *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 87, no. 1, pp. 103–114, 1989.

Ruiz JA, Correa JE, Ayuque G, Landeo L, Yaranga M, Zacarías A. 2007. Producción in vitro de embriones partenogénéticos de alpaca y llama. I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú.

Ruiz JA, Correa JE. 2007. Maduración in vitro de ovocitos de alpaca y llama aspirados vía laparoscópica. I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú.

Ruiz J. 2011. Producción y tecnología en camélidos sudamericanos. Primera edición. Talleres Gráficos Universidad Nacional de Huancavelica. Huancavelica Perú. p169-201.

Ruiz J, Ratto M. 2011. Capacidad de desarrollo de ovocitos recuperados vía aspiración transvaginal en llamas y alpacas. *Spermova* 1;1: 77-79.

Salha O, Abusheika N, Sharma V. 1998. Dynamics of human follicular growth and in vitro oocyte maturation. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 816–32.

Samper JC. 2009. Equine Breeding Management and Artificial Insemination, 2nd, ed., 137pp.

Sánchez F, Smitz J. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1822 (2012) 1896–1912.

Sansinema M, Taylor S, Taylor P, Denniston R, Godke R. 2003. Production of Nuclear Transfer Llama (*Lama glama*) Embryos From in vitro matured llama oocytes. *Cloning Stem cells* 5. p 191-198.

Sansinema M, Taylos S, Taylor P, Schmidt E, Denniston R, Godke R. 2007. In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Animal Reproduction Science* 99: p342-353.

Santayana P, Mendoza J, Landeo L, Mujica F, Ruiz J. 2012. Tiempo de maduración de ovocitos de alpaca en el desarrollo embrionario por fecundación in vitro. Resumen VI congreso mundial de camélidos sudamericanos. Arica-Chile. p163.

Santiani A, Huanca W, Sapana, R, Huanca T, Sepúlveda N, Sánchez R. 2005. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian J. Androl.* 7(3):303-309.

Santiani A. 2012. Uso de dos análogos de superóxido dismutasa para prevenir la desestabilización espermática prematura durante la criopreservación y vitrificación de espermatozoides en alpaca. Tesis Dr. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor De San Marcos. Lima-Perú.

Sawyer HT, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield SJ, McNatty KP. 2002. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol Reprod* 2002; 66:1134–50.

Skidmore JA, Billah M, Allen WR. 1995. The ovarian follicular wave pattern in the mated and non-mated dromedary camel (*Camelus dromedarius*). J. Reprod. Fert. (suppl 49), 545–548.

Somfai T, Bodo S, Nagy S, Papp AB, Ivancsics J, Baranyai B, Gocza E, Kovacs A. 2002. Effect of swim up and percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. Reprod Dom Anim. 2002, 37:285-290.

Steel R, Torrie J. 1985. Bioestadística: Principios y procedimientos. 2^{da} Edición. McGraw-Hill. Bogotá Colombia.

Szybek K. 1972. In-vitro maturation of oocytes from sexually immature mice, Journal Endocrinoly. 54 (1972) 527–528.

Tanaka H, Balladares P, Masaki J, Kanagagua H. 1997. Theory and practice of in vitro fertilization. Japan International Cooperation Agency. Chile.

Taylor U, Rath D, Zerbe H, Schuberth HJ. 2008. Interaction of intact porcine spermatozoa with epithelial cells and neutrophilic granulocytes during uterine passage. Reprod Domest Anim 2008; 43: 166-75.

Trasorras V, Giuliano S, Miragaya M. 2013. In vitro production of embryos in South American camelids. Animal Reproduction Science 136 (2013) 187– 193.

Terreros M, Arriaga I, Huanca W. 2012. Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). Resumen VI Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos. Arica-Chile 2012. P 140.

Turner RM. 2003. Tales from the Tail: What Do We Really Know about Sperm Motility? Journal of Andrology 24, 790-803.

Urrego R, Tarazona A, Olivera M, Camargo O. 2008. Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 21: p398-405.

Vaughan JL, Macmillan KL, D'Occhio MJ. 2004. Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Animal Reproduction Science* 80: 353–361.

Varner DD. 2008. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 70, 448-462.

Wani NA, Wani GM. 2003. Use of epididymal spermatozoa from slaughtered sheep for *in vitro* fertilization of *in vitro* matured oocytes. *Ind. Journal Animal Science*. 73: p143–146.

Wani N. 2009. *In vitro* embryo production in camel (*Camelus dromedarius*) from *in vitro* matured oocytes fertilized with epididymal spermatozoa stored at 4°C. *Animal Reproduction Science*. 111: p 69–79.

Wani NA, Skidmore JA. 2010. Ultrasonographic-guided retrieval of cumulus oocyte complexes after super-stimulation in dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology* 74 (2010) 436–442.

Watson P. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61:481-492.

Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. 2004. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*. 82, E63-E74.

WHO (World Health Organization, SE) 1999. *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interacción*. 4 ed. United Kingdom.

WHO (World Health Organization, SE) 2010. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5 ed. Switzerland.

Zavos PM. 1992. Preparation of human frozen-thawed seminal specimens using the SpermPrep filtration method: improvements over the conventional swim-up method. *Fertil. Steril.* 57: 1326-1330.

Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H. 1998. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. *Int. J. Androl.* 21: 207–16.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: Medio para maduración de *complejos cúmulos-ovocito* (COC)

| Componentes | Concentración | Volumen |
|------------------------|-----------------|------------|
| TCM-199 Stock | 90% | 9 ml |
| FCS | 10% | 1 ml |
| FSH (stock) | 0.02 Unid. / ml | 10 μ l |
| Piruvato de Na (stock) | 0.2 Mm | 20 μ l |
| Gentamicina (stock) | 50 ug/ml | 10 μ l |
| Estradiol 17-B (stock) | 1 ug/ml | 10 μ l |

ANEXO 2: Medio para selección de espermatozoides Sperm TALP

| Componentes | Concentración | Cantidad para preparar 500 μ l |
|---------------------------------------|---------------|------------------------------------|
| NaCl | 100 mM | 292.2 mg |
| KCl | 3.1 mM | 11.55 mg |
| NaHCO ₃ | 25 mM | 105 mg |
| NaH ₂ PO ₄ | 0.3 mM | 1.8 mg |
| Lactato de Na | 21.6 mM | 184 μ l |
| CaCl ₂ (2H ₂ O) | 2 mM | 14.7 mg |
| MgCl ₂ (6H ₂ O) | 0.4 mM | 4.1 mg |
| HEPES | 10 mM | 119 mg |
| Rojo fenol (0.5%) | | 50 μ l |
| Agua mili Q | | 500 μ l |

Suplemento para medio Sperm TALP/Para el día de uso.

| Componentes | Volumen para preparar 1000 μ l |
|-------------------------|------------------------------------|
| Piruvato de Na (stock) | 10 μ l |
| Gentamicina (stock) | 10 μ l |
| BSA fracción V (A-8022) | 60 mg |

ANEXO 3: Medio para fecundación *in vitro* Fert TALP

| Componentes | Concentración | Volumen para preparar 500 µl |
|---------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| NaCl | 114 mM | 333 mg |
| KCl | 3.2 mM | 11.9 mg |
| NaHCO ₃ | 25 mM | 105 mg |
| NaH ₂ PO ₄ | 0.4 mM | 2.4 mg |
| Lactato de Na | 10 mM | 93.5 µl |
| CaCl ₂ (2H ₂ O) | 2 mM | 14.7 mg |
| MgCl ₂ (6H ₂ O) | 0.5 mM | 5 mg |
| Rojo fenol (0.5%) | | 50 µl |
| Agua mili Q | | 500 µl |

Suplemento para medio Fert TALP/Para el día de uso.

| Componentes | Volumen para preparar 1000 µl |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| Piruvato de Na (stock) | 10 µl |
| Gentamicina (stock) | 10 µl |
| BSA libre de grasa (A-6003) | 60 mg |

ANEXO 4: Preparación de stocks para medios utilizados en IVF**Stock FSH**

| Componente | Cantidad |
|-----------------------------|-----------------|
| FSH | 20 U |
| Solución fisiológica 0.09 % | 100 µl |

Stock piruvato de sodio

| Componente | Cantidad |
|-----------------------------|-----------------|
| Ácido pirúvico | 11 mg |
| Solución fisiológica 0.09 % | 1000 µl |

Stock gentamicina

| Componente | Cantidad |
|--------------------------------------|-----------------|
| Sulfato de gentamicina 160 mg x 2 ml | 50 mg |
| Solución fisiológica al 0.09 % | 1000 µl |

Stock estradiol

| Componente | Cantidad |
|-------------------|-----------------|
| Estradiol-17b | 5 mg |
| Etanol absoluto | 5000 µl |

Stock TCM

| Componente | Cantidad para 50 ml |
|-------------------------|----------------------------|
| TCM-199 | 0.75 g |
| NaHCO ₃ | 0.11 g |
| HEPES | 0.297 g |
| Agua mili Q (Completar) | 50 ml |

ANEXO 5: Motilidad progresiva espermática de epidídimo de alpaca, descongelado, antes y después de la selección por los métodos *swim-up* y *washing*; según epidídimos y pajillas.

| Epidídimo (Alpaca) | Pajilla (Sesión IVF) | Motilidad (%) | | |
|-----------------------|----------------------------|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | | Pre- selección | Post-selección <i>Swim up</i> | Post-selección <i>Washing</i> |
| 1 | 1 | 30 | 25 | 20 |
| | 2 | 30 | 27 | 25 |
| | 3 | 30 | 18 | 30 |
| 2 | 4 | 30 | 30 | 30 |
| | 5 | 30 | 12 | 15 |
| 3 | 6 | 25 | 11 | 20 |
| | 7 | 30 | 30 | 30 |
| 4 | 8 | 30 | 6 | 30 |
| | 9 | 30 | 20 | 20 |
| 5 | 10 | 15 | 14 | 14 |
| | 11 | 15 | 21 | 20 |
| 6 | 12 | 15 | 8 | 19 |
| 7 | 13 | 17 | 14 | 23 |
| Promedio | | 25.15 | 18.15 | 22.77 |
| DE | | 5.96 | 6.78 | 4.83 |

ANEXO 6: Vitalidad espermática de epidídimo de alpaca, descongelado, antes y después de selección a través de los métodos *swim-up* y *washing*; según epidídimos y pajillas.

| Epidídimo (Alpaca) | Pajilla (Sesión IVF) | Vitalidad (%) | | |
|-----------------------|----------------------------|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | | Pre- selección | Post selección <i>Swim up</i> | Post selección <i>Washing</i> |
| 1 | 1 | 32 | 28 | 21 |
| | 2 | 32 | 32 | 32 |
| | 3 | 30 | 19 | 35 |
| 2 | 4 | 30 | 32 | 45 |
| | 5 | 30 | 12 | 19 |
| 3 | 6 | 27 | 12 | 24 |
| | 7 | 35 | 30 | 37 |
| 4 | 8 | 47 | 10 | 33 |
| | 9 | 47 | 35 | 45 |
| 5 | 10 | 32 | 32 | 16 |
| | 11 | 32 | 24 | 20 |
| 6 | 12 | 16 | 9 | 20 |
| 7 | 13 | 20 | 17 | 28 |
| Promedio | | 31.54 | 22.46 | 28.85 |
| DE | | 5.57 | 8.58 | 8.30 |

Spz=Espermatozoides.

ANEXO 7a: Concentración espermática de epidídimos de alpacas, descongelados, antes y después de selección por swim-up y washing.

| Epidídimo (Alpaca) | Pajilla (Sesión IVF) | Concentración antes de selección | | | | Concentración post selección (espermatozoides recuperados) | | | | |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------|--|---------------------------------------|----------------------|-------------------|---------------------------------------|
| | | Concentración (inicial) | | Espermatozoides recuperados en: | | Posterior a Swim up | | Posterior a washing | | |
| | | Por 1 ml | Por 1 pajilla (0,25 ml) | Por 100 µl | 1 ml | Motilidad* (%) | Concentración mótil* (Cant.)/ml | 1 ml | Motilidad* (%) | Concentración mótil* (Cant.)/ml |
| 1 | 1 | 102500000.00 | 256250000.00 | 102500000.00 | 3750000 | 0.25 | 9375000.00 | 350000000 | 0.2 | 70000000 |
| | 2 | 102500000.00 | 256250000.00 | 102500000.00 | 21250000 | 0.27 | 5737500.00 | 340000000 | 0.25 | 85000000 |
| | 3 | 60000000.00 | 150000000.00 | 60000000.00 | 13000000 | 0.18 | 2340000.00 | 275000000 | 0.3 | 82500000 |
| 2 | 4 | 60000000.00 | 150000000.00 | 60000000.00 | 12000000 | 0.3 | 3600000.00 | 325000000 | 0.3 | 97500000 |
| | 5 | 60000000.00 | 150000000.00 | 60000000.00 | 2000000 | 0.12 | 240000.00 | 600000000 | 0.15 | 90000000 |
| 3 | 6 | 70000000.00 | 175000000.00 | 70000000.00 | 16000000 | 0.11 | 1760000.00 | 175000000 | 0.2 | 35000000 |
| | 7 | 150000000.00 | 375000000.00 | 150000000.00 | 14000000 | 0.3 | 4200000.00 | 225000000 | 0.3 | 67500000 |
| 4 | 8 | 225000000.00 | 562500000.00 | 225000000.00 | 2750000 | 0.06 | 165000.00 | 225000000 | 0.3 | 67500000 |
| | 9 | 225000000.00 | 562500000.00 | 225000000.00 | 4000000 | 0.2 | 800000.00 | 425000000 | 0.2 | 85000000 |
| 5 | 10 | 60000000.00 | 150000000.00 | 60000000.00 | 5000000 | 0.14 | 700000.00 | 500000000 | 0.14 | 70000000 |
| | 11 | 60000000.00 | 150000000.00 | 60000000.00 | 75000000 | 0.21 | 15750000.00 | 1300000000 | 0.2 | 260000000 |
| 6 | 12 | 475000000.00 | 1187500000.00 | 475000000.00 | 2500000 | 0.08 | 200000.00 | 1275000000 | 0.19 | 242250000 |
| 7 | 13 | 475000000.00 | 1187500000.00 | 475000000.00 | 5000000 | 0.14 | 700000.00 | 750000000 | 0.23 | 172500000 |
| Promedio | | 66,538,461.54 | 16,634,615.38 | 6,653,846.15 | 13,557,692.31 | 0.18 | 2,856,153.85 | 52,038,461.54 | 0.23 | 10,959,615.38 |
| Desviación estándar | | 24,437,869.82 | 6,109,467.46 | 2,443,786.98 | 11,079,881.66 | 0.07 | 2,748,136.09 | 28,360,946.75 | 0.05 | 5,322,485.21 |

Spz=Espermatozoides.

*Motilidad progresiva

ANEXO 7b: Número de ovocitos por gota de fecundación y volumen de espermatozoides mótils progresivos recuperados por los métodos swim-up y washing utilizados para fecundar in vitro, cada gota de fecundación, según epidídimos y pajillas descongeladas.

| Epidídimo (Alpaca) | Pajilla (Sesión IVF) | swim-up | | | | | | | | | | washing | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------|----------|--------------------|------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|------------------|----------------|---------------------------|-----------------------|------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------|------------------|----------------|----------|-----------|-----------|----------|------------|-------------------|----------------|
| | | Gotas de medio IVF | | | | | Concentración de Spz* | | | | | Gotas de medio IVF | | | | | Concentración de Spz* | | | | | | | | | | | | | |
| | | N° | Volumen /gota (µl) | N° ovocitos /gota (Promedio) | Volumen promedio Spz/gota (µl) | Volumen total promedio (µl)/gota | Recuperada /ml | Final Spz/ml | N° | Volumen /gota (µl) | N° ovocitos /gota (Promedio) | Volumen promedio Spz/gota (µl) | Volumen total promedio (µl)/gota | Recuperada /ml | Final Spz/ml | N° | Volumen /gota (µl) | N° ovocitos /gota (Promedio) | Volumen promedio Spz/gota (µl) | Volumen total promedio (µl)/gota | Recuperada /ml | Final Spz/ml | | | | | | | | |
| 1 | 1 | 3 | 45 | 16 | 11 | 56 | 937,500 | 184,152 | 3 | 45 | 15 | 2 | 47 | 7,000,000 | 250,000 | 2 | 45 | 11 | 4 | 49 | 5,737,500 | 468,367 | 2 | 45 | 11 | 3 | 48 | 8,500,000 | 447,368 | |
| | 2 | 2 | 45 | 11 | 4 | 49 | 5,737,500 | 468,367 | 2 | 45 | 11 | 3 | 48 | 8,500,000 | 447,368 | 3 | 45 | 13 | 9 | 54 | 2,340,000 | 376,669 | 3 | 45 | 13 | 3 | 48 | 8,250,000 | 515,625 | |
| 2 | 3 | 3 | 45 | 13 | 9 | 54 | 2,340,000 | 376,669 | 3 | 45 | 13 | 3 | 48 | 8,250,000 | 515,625 | 4 | 45 | 14 | 7 | 52 | 3,600,000 | 504,459 | 3 | 45 | 13 | 3 | 48 | 9,750,000 | 609,375 | |
| | 4 | 3 | 45 | 14 | 7 | 52 | 3,600,000 | 504,459 | 3 | 45 | 13 | 3 | 48 | 9,750,000 | 609,375 | 5 | 45 | 5 | 15 | 60 | 240,000 | 60,000 | 1 | 45 | 6 | 1 | 46 | 9,000,000 | 98,901 | |
| | 5 | 1 | 45 | 5 | 15 | 60 | 240,000 | 60,000 | 1 | 45 | 6 | 1 | 46 | 9,000,000 | 98,901 | 6 | 45 | 13 | 11 | 56 | 1,760,000 | 337,246 | 3 | 45 | 13 | 7 | 52 | 3,500,000 | 441,748 | |
| 3 | 6 | 3 | 45 | 13 | 11 | 56 | 1,760,000 | 337,246 | 3 | 45 | 13 | 7 | 52 | 3,500,000 | 441,748 | 7 | 45 | 16 | 9 | 54 | 4,200,000 | 689,164 | 3 | 45 | 16 | 6 | 51 | 6,750,000 | 794,118 | |
| | 7 | 3 | 45 | 16 | 9 | 54 | 4,200,000 | 689,164 | 3 | 45 | 16 | 6 | 51 | 6,750,000 | 794,118 | 8 | 45 | 11 | 14 | 59 | 165,000 | 39,153 | 3 | 45 | 10 | 1 | 46 | 6,750,000 | 122,727 | |
| 4 | 8 | 2 | 45 | 11 | 14 | 59 | 165,000 | 39,153 | 3 | 45 | 11 | 1 | 46 | 6,750,000 | 122,727 | 9 | 45 | 10 | 13 | 58 | 800,000 | 173,913 | 2 | 45 | 10 | 2 | 47 | 8,500,000 | 274,194 | |
| | 9 | 2 | 45 | 10 | 13 | 58 | 800,000 | 173,913 | 2 | 45 | 10 | 2 | 47 | 8,500,000 | 274,194 | 10 | 45 | 13 | 13 | 58 | 700,000 | 156,897 | 3 | 45 | 13 | 2 | 47 | 7,000,000 | 225,806 | |
| 5 | 10 | 3 | 45 | 13 | 13 | 58 | 700,000 | 156,897 | 3 | 45 | 13 | 2 | 47 | 7,000,000 | 225,806 | 11 | 45 | 18 | 6 | 51 | 15,750,000 | 1,943,182 | 3 | 45 | 18 | 4 | 49 | 26,000,000 | 2,000,000 | |
| | 11 | 3 | 45 | 18 | 6 | 51 | 15,750,000 | 1,943,182 | 3 | 45 | 18 | 4 | 49 | 26,000,000 | 2,000,000 | 12 | 45 | 5 | 21 | 66 | 200,000 | 63,636 | 2 | 45 | 5 | 1 | 46 | 24,225,000 | 266,209 | |
| 6 | 12 | 2 | 45 | 5 | 21 | 66 | 200,000 | 63,636 | 2 | 45 | 5 | 1 | 46 | 24,225,000 | 266,209 | 13 | 45 | 10 | 13 | 58 | 700,000 | 160,920 | 3 | 45 | 10 | 1 | 46 | 17,250,000 | 251,825 | |
| | 13 | 3 | 45 | 10 | 13 | 58 | 700,000 | 160,920 | 3 | 45 | 10 | 1 | 46 | 17,250,000 | 251,825 | Promedio | 3 | 45 | 12 | 11 | 56 | 2,856,154 | 396,750 | 3 | 45 | 12 | 2 | 47 | 10,959,615 | 484,454 |
| Desviación estandar | | 1 | 0 | 3 | 3 | 3 | 2,748,136 | 310,488 | 1 | 0 | 3 | 2 | 2 | 5,322,485 | 304,816 | Spz=Espermatozoide | | | | | | | | | | | | | | |

*Con motilidad progresiva.

ANEXO 8: Tasa de fecundación de ovocitos inseminados con espermatozoides descongelados de epidídimo de alpaca y, seleccionados mediante los métodos *swim up* y *washing*.

| Epidídimo (Alpaca) | Pajilla (Sesión IVF) | Segmentados (<i>Cleavage</i>) | | | | | |
|-----------------------|----------------------------|---------------------------------|--------------|-----------|-------------------------------|--------------|-----------|
| | | Post selección <i>swim up</i> | | | Post selección <i>washing</i> | | |
| | | Ovocitos expuestos* | Cantidad | % | Ovocitos expuestos* | Cantidad | % |
| 1 | 1 | 48 | 22 | 46 | 46 | 16 | 35 |
| | 2 | 23 | 10 | 43 | 21 | 5 | 24 |
| | 3 | 41 | 14 | 34 | 40 | 17 | 43 |
| 2 | 4 | 42 | 13 | 31 | 39 | 13 | 33 |
| | 5 | 5 | 0 | 0 | 6 | 2 | 33 |
| 3 | 6 | 37 | 4 | 11 | 39 | 9 | 23 |
| | 7 | 47 | 16 | 34 | 49 | 15 | 31 |
| 4 | 8 | 21 | 10 | 48 | 29 | 18 | 62 |
| | 9 | 20 | 14 | 70 | 19 | 15 | 79 |
| 5 | 10 | 38 | 16 | 42 | 39 | 13 | 33 |
| | 11 | 55 | 22 | 40 | 55 | 29 | 53 |
| 6 | 12 | 10 | 3 | 30 | 10 | 1 | 10 |
| 7 | 13 | 31 | 3 | 10 | 29 | 2 | 7 |
| Total | | 418 | 147 | | 421 | 155 | |
| Promedio | | 32.15 | 11.31 | 35 | 32.38 | 11.92 | 37 |
| DE | | 12.76 | 5.82 | | 12.36 | 6.25 | |

*Ovocitos expuestos a espermatozoides para fecundación.

ANEXO 9: Análisis de varianza para métodos de selección espermática *swim-up* (S) y *washing* (W) de la motilidad espermática progresiva, y comparación de medias (*Tukey*). Analizados utilizando el paquete estadístico SAS versión 8.0 para Windows (1999-2001) por SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

| Fuente de variación | G.L. | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | Valor F | Pr > F |
|------------------------------|------|-------------------|------------------|---------|--------|
| Métodos de selección (S y W) | 1 | 0.03169115 | 0.03169115 | 3.07 | 0.1050 |
| Epidídimos (Métodos) | 12 | 0.07641936 | 0.00636828 | 0.62 | 0.7919 |
| Error | 12 | 0.12367718 | 0.01030643 | | |
| Total | 25 | 0.22652999 | | | |

| Grupos Tukey | Media | N | Método |
|--------------|---------|----|--------|
| A | 0.49455 | 13 | W |
| A | | | |
| A | 0.43078 | 13 | S |

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

ANEXO 10: Análisis de varianza para métodos de selección espermática *swim-up* (S) y *washing* (W) de vitalidad espermática, y comparación de medias (Tukey). Analizados utilizando el paquete estadístico SAS versión 8.0 para Windows (1999-2001) por SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

| Fuente de variación | G.L. | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | Valor F | Pr > F |
|------------------------------|------|-------------------|------------------|---------|--------|
| Métodos de selección (S y W) | 1 | 0.03908329 | 0.03908329 | 2.63 | 0.1309 |
| Epididimos (Métodos) | 12 | 0.13925533 | 0.01160461 | 0.78 | 0.6625 |
| Error | 12 | 0.17836081 | 0.01486340 | | |
| Total | 25 | 0.35686770 | | | |

| Grupo Tukey | Media | N | Método |
|-------------|---------|----|--------|
| A | 0.56202 | 13 | W |
| A | | | |
| A | 0.48431 | 13 | S |

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

ANEXO 11: Análisis de varianza para métodos de selección espermática *swim-up* (S) y *washing* (W) de la concentración espermática, y comparación de medias (Tukey). Analizados utilizando el paquete estadístico SAS versión 8.0 para Windows (1999-2001) por SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

| Fuente de variación | G.L. | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | Valor F | Pr > F |
|------------------------------|------|-------------------|------------------|---------|--------|
| Métodos de selección (S y W) | 1 | 1.2727733E16 | 1.2727733E16 | 22.78 | 0.0005 |
| Epidídimos (Métodos) | 12 | 1.4840219E16 | 1.2366849E15 | 2.21 | 0.0916 |
| Error | 12 | 6.7054063E15 | 5.5878385E14 | | |
| Total | 25 | 3.1170627E16 | | | |

| Grupo Tukey | Media | N | Método |
|-------------|----------|----|--------|
| A | 52038462 | 13 | W |
| B | 13557692 | 13 | S |

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

ANEXO 12: Análisis de varianza para métodos de selección espermática *swim-up* (S) y *washing* (W) de la tasa de segmentación embrionaria, y comparación de medias (*Tukey*). Analizados utilizando el paquete estadístico SAS versión 8.0 para Windows (1999-2001) por SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

| Fuente de variación | G.I. | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | Valor F | Pr > F |
|------------------------------|------|-------------------|------------------|---------|--------|
| Métodos de selección (S y W) | 1 | 0.00005280 | 0.00005280 | 0.00 | 0.9676 |
| Epidídimos (Métodos) | 12 | 0.96385781 | 0.08032148 | 2.61 | 0.0550 |
| Error | 12 | 0.36928325 | 0.03077360 | | |
| Total | 25 | 1.34318802 | | | |

| Grupo Tukey | Mean | N | Método |
|-------------|---------|----|--------|
| A | 0.63023 | 13 | W |
| A | 0.59091 | 13 | S |

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.