



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Efecto del co-cultivo in vitro de las células de la
granulosa y ovocitos en la maduración ovocitaria de
alpaca (*Vicugna pacos*)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista
Biotecnóloga

AUTOR

Stefanny Lizeth VILLARREAL UGARTE

ASESOR

Mg. Zezé Humberto BRAVO GUTIERREZ

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Villarreal, S. (2021). *Efecto del co-cultivo in vitro de las células de la granulosa y ovocitos en la maduración ovocitaria de alpaca (Vicugna pacos)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Stefanny Lizeth Villarreal Ugarte.
DNI	72874160
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-2481-7061
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Zeze Humberto Bravo Gutiérrez
DNI	42952975
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-8539-9262
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.2.3. Biotecnología en Recursos Genéticos B.4.2.3. Reproducción animal
Grupo de investigación	Biotecnología reproductiva para la conservación y mejora genética animal (BIOTRA)
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Promoción de Tesis de Pregrado. Resolución rectoral N°. RR-4692-19, proyecto con código B19100854 Perú. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondecyt) – Proyecto de Investigación Básica 2019. 428-2019-FONDECYT.

Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Latitud: -12.056445 Longitud: -77.085994
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Junio 2019 - marzo 2020
URL de disciplinas OCDE	Biología del desarrollo https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.09 Biología reproductiva https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.08 Biología celular, Microbiología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA GENETISTA BIOTECNÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)**

Siendo las 15:03 horas del 16 de setiembre de 2021, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue <https://meet.google.com/kzo-gixv-ate>, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** de **STEFANNY LIZETH VILLARREAL UGARTE**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20210040558, la titulando expuso su tesis: **“EFECTO DEL CO-CULTIVO *IN VITRO* DE LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA Y OVOCITOS EN LA MADURACIÓN OVOCITARIA DE ALPACA (*Vicugna pacos*)”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota **19**, calificativo: **APROBADO CON MÁXIMOS HONORES**.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** a **STEFANNY LIZETH VILLARREAL UGARTE** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título conforme a ley.

Siendo las 17:10 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 16 de setiembre de 2021.

**Mg. CARMEN PANTIGOSO FLORES
(PRESIDENTA)**

**Mg. ZEZE BRAVO GUTIERREZ
(ASESOR)**

**Mg. GIOVANNA SOTIL CAYCHO
(MIEMBRO)**

**Mg. EDITH RODRIGUEZ QUISPE
(MIEMBRO)**

RESUMEN

Durante los últimos años, estudios sobre las células de granulosa (CG) procedentes del ovario femenino han demostrado una gran versatilidad y un gran potencial de utilidad a nivel de co-cultivo y como células madre con capacidad de pluripotencia. Por ello, como parte de diversos procedimientos biotecnológicos reproductivos en diferentes especies, las CG han venido ayudando a solucionar problemas reproductivos. Con tal enfoque, se planteó evaluar en alpacas el cultivo *in vitro* de 2 tipos de CG, las células de granulosa murales (CGM) y células de granulosa del cúmulus (CC), y, además, el efecto de las CG en co-cultivo con el ovocito durante su maduración ovocitaria *in vitro*. Para ello, esta tesis se desarrolló con muestras de ovarios y testículos de alpaca post beneficio, procedentes del departamento de Huancavelica trasladados al laboratorio a 10 °C. En este trabajo se utilizaron 522 ovarios y 3 epidídimos de alpaca, y el diseño experimental de conformó de 4 etapas: la primera etapa abarcó el aislamiento y purificación de las CGM y CC; la segunda etapa consistió en el cultivo *in vitro* de las CGM y CC, monitoreándolos por el periodo que dura el cultivo primario (144 h – 168 h); la tercera etapa corresponde al co-cultivo de las CGM o CC (cultivadas en la segunda etapa) con los ovocitos durante el periodo de maduración ovocitaria *in vitro*, con la evaluación de los ovocitos post maduración *in vitro*; y finalmente, la cuarta etapa se basó en la producción de embriones a partir de los ovocitos obtenidos de la tercera etapa, ya sea embriones por la técnica de activación química o por Fertilización *in vitro* (FIV), con el monitoreo de los estadíos durante el desarrollo embrionario. Para el análisis estadístico de los datos obtenidos de maduración ovocitaria y desarrollo embrionario se usó la prueba de Chi-Cuadrado. No se observó una diferencia significativa entre los porcentajes de maduración obtenidos, 18.02% en el grupo control (ovocito que maduraron sin co-cultivo), 18.64% en el tratamiento CGM (ovocitos que maduraron en co-cultivo con las CGM), y 18.75% en el tratamiento CC (ovocitos que maduraron en co-cultivo con las CC). Con respecto al desarrollo embrionario se empleó la técnica de

activación química y FIV, en esta parte solo se usaron los ovocitos del control y tratamiento CGM previo. Se obtuvo una diferencia significativa a favor de la activación química con un 35.71% de desarrollo embrionario con respecto al FIV que llegó a un 9.26%. Se puede concluir que el efecto del co-cultivo durante la maduración ovocitaria influyó de manera positiva en la calidad de ovocitos maduros, como también en el efecto derivado sobre el desarrollo embrionario independientemente de cada técnica de producción embrionaria usada.

Palabras clave

Células de granulosa murales, células del cúmulus, cultivo *in vitro*, maduración ovocitaria, alpaca.

ABSTRACT

In recent years, studies on granulosa cells (GC) from the female ovary have shown great versatility and great potential for utility at the level of co-culture and as stem cells with pluripotency capacity. Therefore, as part of various reproductive biotechnological procedures in different species, CGs have been helping to solve reproductive problems. With this approach, it was proposed to evaluate the in vitro culture of 2 types of GC in alpacas, the mural granulosa cells (CGM) and cumulus granulosa cells (CC), and, in addition, the effect of the GC in co-culture with the oocyte during its in vitro oocyte maturation. For this, this thesis was developed with post-benefit alpaca ovaries and testes samples from the department of Huancavelica transferred to the laboratory at 10 ° C. In this work, 522 ovaries and 3 epididymides of alpaca were used, and the experimental design consisted of 4 stages: the first stage included the isolation and purification of the CGM and CC; the second stage consisted of the in vitro culture of the CGM and CC, monitoring them for the period that the primary culture lasts (144 h - 168 h); the third stage corresponds to the co-culture of the CGM or CC (cultivated in the second stage) with the oocytes during the in vitro oocyte maturation period, with the evaluation of the in vitro post maturation oocytes; and finally, the fourth stage was based on the production of embryos from the oocytes obtained from the third stage, either embryos by the chemical activation technique or by in vitro fertilization (IVF), with the monitoring of the stages during the embryonic development. For the statistical analysis of the data obtained on oocyte maturation and embryonic development, the Chi-Square test was used. No significant difference was observed between the maturation percentages obtained, 18.02% in the control group (oocytes that matured without co-culture), 18.64% in the CGM treatment (oocytes that matured in co-culture with the CGM), and 18.75% in the CC treatment (oocytes that matured in co-culture with the CC). Regarding embryonic development, the chemical activation technique and IVF were used, in this part, only the oocytes from the control and previous CGM treatment were

used. A significant difference was obtained in favor of chemical activation with 35.71% of embryonic development concerning IVF that reached 9.26%. It can be concluded that the effect of co-culture during oocyte maturation positively influenced the quality of mature oocytes, as well as the derived effect on embryonic development regardless of each embryo production technique used.

Keywords

Mural granulosa cells, cumulus cells, in vitro culture, oocyte maturation, alpaca.

DEDICATORIA

A Ernestina Villarreal y Ernestina Castro, sin
ustedes nada de esto hubiera sido posible.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento

A Dios por guiar mi camino y permitirme llegar hasta aquí.

A mi papa, Jesús, que me apoyó incondicionalmente desde siempre; a mi mamá, Maruja, que desde pequeña me motivo a esforzarme para lograr mis objetivos. A mi hermano, Jhonatan, por sus consejos, amistad y risas. Los amo mucho.

A mi profesora Martha Valdivia, por abrirme las puertas de su laboratorio y apoyarme en el camino de la investigación. Gracias por todo.

A mi asesor Zezé Bravo, por sus consejos, apoyo y guía; antes, durante y después de este proyecto. Muchísimas gracias.

A Tania, Paty y Christian quienes me orientaron y apoyaron siempre que los necesité.

A Mapi, Cathy, Emanuel, Luz y Rubén, quienes hicieron que esta aventura sea muchísimo más divertida, de grandes y buenas experiencias.

A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción, gracias por su apoyo y amistad.

A mis mejores amigos Claudia y Marlon, por su incondicionalidad y por los gratos momentos compartidos.

En especial a la familia Bauer, que sin su apoyo y consejos no me hubiera sido posible realizar este objetivo.

Al Programa de Promoción de Tesis de Pregrado con resolución rectoral N°. RR-4692-19, proyecto con código B19100854; al Proyecto de investigación Básica Fondecyt 2019; y al Proyecto de equipamiento científico de la UNMSM - 2017.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
TABLA DE CONTENIDO.....	1
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ABREVIATURAS	8
I. INTRODUCCIÓN	9
II. MARCO TEÓRICO.....	11
2.1. La alpaca y su situación reproductiva actual	11
2.2. Maduración ovocitaria <i>in vitro</i>	12
2.3. Foliculogénesis: interacción ovocito - células de granulosa (CGM y CC).....	13
2.4. Células de granulosa (CG).....	15
2.4.1. Células de granulosa murales (CGM)	18
2.4.2. Células de granulosa del cúmulus (CC)	20
2.5. Usos biotecnológicos de las células de granulosa.....	21
2.6. Cultivo celular <i>in vitro</i> de células animales	23
2.6.1. Factores que influyen en el cultivo celular <i>in vitro</i>	24
2.6.2. Tipos de cultivo celular	26

2.6.3. Tipos de morfología de célula cultivadas	28
2.7. Fertilización <i>in vitro</i> (FIV).....	29
2.8. Desarrollo embrionario <i>in vitro</i>	30
2.9. Partenogénesis y activación química.....	31
III. HIPÓTESIS Y VARIABLES	33
3.1. Hipótesis	33
3.2. Variables.....	33
IV. OBJETIVOS	34
4.1. Objetivo general	34
4.2. Objetivos específicos	34
V. MATERIALES Y MÉTODOS	35
5.1. Lugar de estudio.....	35
5.2. Materiales.....	35
5.2.1. Material biológico.....	35
5.2.2. Medios de cultivo y reactivos	35
5.2.3. Equipos y materiales de laboratorio	38
5.3. Métodos	40
5.3.1. Colecta y traslado de la muestra biológica	40
5.3.2. Lavado de la muestra biológica	40
5.3.3. Aspiración y colecta del fluido folicular (FF)	40
5.3.4. Aislamiento y lavado de los ovocitos.....	40
5.3.5. Aislamiento y lavado de las células de granulosa	41
5.3.6. Evaluación de la vitalidad y concentración de las células de granulosa ..	43

5.3.7.	Purificación y post lavados de las células de granulosa murales	45
5.3.8.	Medio de cultivo de las células de granulosa	45
5.3.9.	Co-cultivo de las células de granulosa y el CCO, durante la maduración ovocitaria <i>in vitro</i>	46
5.3.10.	Evaluación de la maduración ovocitaria	46
5.3.11.	Selección espermática.....	47
5.3.12.	Fertilización <i>in vitro</i> (FIV)	47
5.3.13.	Activación química.....	47
5.3.14.	Cultivo de embriones	48
5.3.15.	Evaluación del desarrollo embrionario	48
5.3.16.	Análisis estadístico	48
VI.	RESULTADOS.....	50
6.1.	Morfología de las células de granulosa	50
6.2.	Cultivo celular <i>in vitro</i> de las células de granulosa murales	50
6.3.	Cultivo celular <i>in vitro</i> de las células de granulosa del cúmulus.....	54
6.4.	Efecto del co-cultivo de las células de granulosa murales - ovocitos.....	59
6.5.	Efecto del co-cultivo de las células de granulosa del cúmulus - ovocitos.....	61
6.6.	Efecto derivado del co-cultivo con las células de granulosa sobre el desarrollo embrionario	66
VII.	DISCUSIÓN	72
7.1.	Cultivo <i>in vitro</i> de las células de granulosa murales	72
7.2.	Cultivo <i>in vitro</i> de las células de granulosa del cúmulus	74
7.3.	Plasticidad de las células de granulosa (CGM y CC).....	75

7.4.	Efecto de las células de granulosa murales co-cultivadas con los ovocitos durante su maduración ovocitaria.....	77
7.5.	Efecto de las células de granulosa del cúmulus co-cultivadas con los ovocitos durante la maduración ovocitaria.....	79
7.6.	Efecto derivado del co-cultivo sobre el desarrollo embrionario	80
VIII.	CONCLUSIONES.....	82
IX.	RECOMENDACIONES	83
X.	BIBLIOGRAFÍA	84
XI.	ANEXO	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número ovocitos y el porcentaje de maduración ovocitaria <i>in vitro</i>	61
Tabla 2. Número de embriones y porcentaje del desarrollo embrionario producido por activación química.....	67
Tabla 3. Estadíos embrionarios obtenidos por activación química.....	68
Tabla 4. Número de embriones y porcentaje del desarrollo embrionario producido por FIV	68
Tabla 5. Estadíos embrionarios obtenidos por FIV	69
Tabla 6. Diferencia de porcentaje embrionario obtenido por activación química y FIV	69
Tabla 7. Diferencia de número de embriones por estadío obtenidos por las técnicas de activación química y FIV	70
Tabla 8. Monitoreo de la vitalidad previo y posterior a la etapa de purificación de las CGM (pre y post-Percoll); y durante el cultivo de 168 h de las CGM	94
Tabla 9. Monitoreo de la concentración celular previo y posterior a la etapa de purificación de las CGM (pre y post-Percoll); y durante el cultivo de 168 h de las CGM	95
Tabla 10. Monitoreo de la vitalidad durante el cultivo de 144 h de las CC	95
Tabla 11. Monitoreo de la concentración celular durante el cultivo de 144 h de las CC	96
Tabla 12. Porcentaje de la maduración ovocitaria del grupo control y tratamiento CGM	96
Tabla 13. Porcentaje de la maduración ovocitaria del grupo control y tratamiento CC	97
Tabla 14. Porcentaje del desarrollo embrionario de los ovocitos del grupo control y tratamiento CGM.....	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo del folículo dependiente de las CGM y las CC.....	15
Figura 2. Interacción entre el ovocito y las células de granulosa	16
Figura 3. Folículo antral. Células de granulosa clasificadas según su ubicación estructural: CGM y CC	17
Figura 4. Morfología de las células de granulosa	18
Figura 5. Comunicación CGM-CGM a través de uniones gap	19
Figura 6. Vías de comunicación paracrina entre el ovocito.....	21
Figura 7. Morfología de células cultivadas <i>in vitro</i>	29
Figura 8: Estadios del desarrollo embrionario de la alpaca	31
Figura 9. Flujo de trabajo. Aspiración y colecta del fluido folicular. Aislamiento, purificación y cultivo de las CGM de alpaca.	42
Figura 10. Vitalidad de las células de granulosa murales	43
Figura 11. Células de granulosa murales en una	44
Figura 12. Cultivo celular <i>in vitro</i> de las CGM durante 168 h.....	51
Figura 13. Porcentaje promedio de la vitalidad del cultivo de CGM durante su evaluación pre-Percoll, post-Percoll (0 h) y a las 168 h del cultivo	52
Figura 14. Concentración (millón/mL) del cultivo de CGM durante su evaluación pre-Percoll, post-Percoll (0 h) y a las 168 h del cultivo.....	53
Figura 15. Cultivo celular <i>in vitro</i> de las CC durante 144 h	55
Figura 16. Cultivo celular <i>in vitro</i> de las CC durante 264 h	56
Figura 17. Media del porcentaje (%) de vitalidad del cultivo de CC a las 24 h y 120 h	57

Figura 18. Media (Millón/mL) de la concentración del cultivo de CC a las 24 h y 120 h	58
Figura 19. Interacción entre el CCO y las CGM durante la maduración ovocitaria <i>in vitro</i>	59
Figura 20. Ovocitos maduros del grupo control y tratamiento CGM, con presencia del cuerpo polar	60
Figura 21. Interacción entre el CCO y las CC durante la maduración ovocitaria <i>in vitro</i>	62
Figura 22. Ovocitos maduros del grupo control y tratamiento CC, con presencia del cuerpo polar	63
Figura 23. Porcentaje de la maduración ovocitaria <i>in vitro</i>	64
Figura 24. Complejo cúmulus-ovocito con sus CC diferenciadas	65
Figura 25. Embriones obtenidos por activación química	66
Figura 26. Desarrollo embrionario obtenido por cada técnica de producción embrionaria	71

ABREVIATURAS

PBS: Buffer fosfato salino

BSA: Albúmina sérica bovina

CGM: Células de Granulosa Murales

CC: Células de Granulosa del Cúmulo

CCO: Complejo cúmulo- ovocito

eCG: Gonadotropina coriónica equina

FCE: Factor de crecimiento epidérmico

FCF-2: Factor de crecimiento fibroblástico tipo II

FCI-1: Factor de crecimiento insulínico tipo I

FF: Fluido folicular

FIV: Fertilización *in vitro*

FSH: Hormona folículo estimulante

ICSI: Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoide

MEM: Medio esencial mínimo

MII: Metafase II

MIV: Maduración *in vitro*

PHE: Penicilamina-Heparina - Hipotaurina

RPM: Revoluciones por minuto

SFB: Suero fetal bovino

TCM: Medio de cultivo de tejidos

I. INTRODUCCIÓN

Las alpacas (*Vicugna pacos*) son consideradas especies de difícil manejo reproductivo debido a diversos factores que alteran su reproducción como su dieta y sus características fisiológicas (Quispe, 2019). La crianza de alpacas en su gran mayoría en el Perú se ha venido desarrollando sin la implementación tecnológica necesaria en su proceso reproductivo. A raíz de esto, y debido a que las alpacas son de importancia para la economía de nuestro país y principalmente para los pobladores que viven en base al comercio de este animal (MINAGRI, 2017), diversos investigadores se han visto enfocados en ayudar a solucionar estos problemas reproductivos y así también aprovechar el material genético de esta especie.

Para poder entender mejor la reproducción de las alpacas es necesario investigar la fisiología de los machos como de las hembras. En el caso de la hembra tenemos al órgano reproductor llamado ovario, dentro del cual se encuentran los folículos que albergan a los ovocitos (gameto sexual femenino). El folículo tiene la función principal de producir un ovocito maduro capaz de ser fertilizado (De Figueiredo et al., 2018). En este sentido, el proceso de la foliculogénesis (desarrollo de las células del folículo) se da en simultáneo a la ovogénesis (desarrollo del ovocito). Durante la foliculogénesis se evidencian interacciones bidireccionales entre las células de granulosa (células somáticas del folículo) y el ovocito, lo que conlleva a la maduración del ovocito. Cuando el ovocito ya está maduro y antes de eclosionar del folículo, el folículo en el que se encuentra se denomina folículo de Graaf (Kulus et al., 2020), y es entonces que se observa una estructura peculiar, el ovocito se encuentra rodeado de células de granulosa (CG). Las CG se dividen en células del cúmulus (CC), quienes tienen una interacción directa con el gameto, y las células de granulosa murales (CGM) que se encuentran apoyadas en la lámina basal del folículo. Además, existen las denominadas células de la teca que tapizan el folículo, pero que a su vez mantienen una interacción con las células de granulosa murales (Liu et al., 2017).

Debido a la estrecha interacción entre las células de granulosa y el ovocito, se han realizado investigaciones de co-cultivo entre estos durante la etapa de maduración ovocitaria *in vitro*, generando resultados alentadores en cuanto a la tasa de maduración e incluso desarrollo embrionario (Jahromi et al., 2015; Konishi et al., 1996). Esta técnica se ha ido perfeccionando y ha sido aplicada en la parte clínica en humanos con buenos resultados (Benkhalifa et al., 2012).

En el caso de las alpacas, las CG no son usadas o simplemente son descartadas durante los tratamientos de reproducción asistida. Al saber de su efecto en otras especies, se formuló esta tesis, que tiene como objetivo principal evaluar el efecto de las CGM y CC en co-cultivo con el ovocito durante su maduración ovocitaria *in vitro*. Adicionalmente, se analizó el efecto derivado de este co-cultivo sobre el desarrollo embrionario posterior. De esta manera, se buscó conocer las bases fisiológicas de las células de granulosa de alpaca para futuras aplicaciones biotecnológicas, además de su modo de interacción *in vitro* con el ovocito durante la maduración ovocitaria *in vitro*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. La alpaca y su situación reproductiva actual

Vicugna pacos es un representante de la familia Camelidae perteneciente a los herbívoros mamíferos placentarios del orden Artiodactyla. Incluye 6 especies, divididas en camélidos de viejo mundo y camélidos del nuevo mundo. Dentro de los camélidos del viejo mundo está el camello arábigo (*Camelus dromedarius*) y el camello (*Camelus bactrianus*). En el caso de los camélidos del nuevo mundo, se encuentran los silvestres, como el guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*), y los domésticos, como la llama (*Lama glama*) y la alpaca (*Vicugna pacos*) (Wojciech et al., 2016).

La crianza de alpacas es de importancia económica para el Perú porque se aprovecha su carne y fibra, esta última tiene gran demanda mundial principalmente por su fina textura y por ello es muy desarrollada (MINAGRI, 2017). Además, los subproductos como las pieles y cueros tienen múltiples aplicaciones, sobre todo en la industria artesanal (FAO, 2005). Así también, nuestro país tiene la mayor población de alpacas a nivel mundial con un 87%, resaltando los departamentos de Puno (55%), Cuzco (12%), Arequipa (10%), y Huancavelica (6%), siendo la raza Huacaya la de mayor población (más del 80%) y con alrededor del 10% tenemos a la raza Suri y las cruzas.

Sin embargo, la crianza de alpacas se realiza alrededor del 99% por los mismos pobladores bajo un sistema extensivo tradicional sin contar en su mayoría con tecnologías reproductivas, basándose exclusivamente en el apareamiento natural dictado por la respuesta conductual de una hembra. Este sistema de crianza es caracterizado por bajos parámetros reproductivos con bajos porcentajes de vientres (madres en edad reproductiva), baja natalidad y un alto índice de mortalidad de las crías (MINAGRI, 2017). Dentro de este contexto, Vaughan et al. (2004) determinaron la onda folicular del ovario de alpacas de alrededor de 10 días, con el fin de poder predecir la etapa de fertilidad idónea de la hembra y así no solo mejorar el apareamiento natural, si

no también, para que sea de apoyo en el uso de las tecnologías de reproducción asistida.

2.2. Maduración ovocitaria *in vitro*

Existen diversos factores que generan problemas reproductivos en las alpacas (*Vicugna pacos*), por lo cual es considerada una especie particular dentro de los camélidos sudamericanos. Entre estos problemas reproductivos tenemos la madurez sexual tardía, ovarios quísticos, involución uterina, bajas tasas de concepción (Quispe, 2019). Además, desde el enfoque del sector sanitario existen enfermedades parasitarias como la toxoplasmosis que causa abortos a las alpacas (Valencia et al., 2009). Esta situación podría mejorar si se emplean herramientas de apoyo como las tecnologías de reproducción asistida, entre estas la Fertilización *in vitro* (FIV) y la Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI).

En el Perú, los centros de investigación que trabajan en esta especie lo hacen con el método de obtención de gametos *post mortem* que es el más frecuente, y en el caso de los ovocitos, garantiza su alto número, pero el grado de maduración de éstos resulta ser baja (Abd El-Aziz et al., 2016). Para lograr obtener un ovocito maduro y ser usado en técnicas de reproducción asistida, éste debe presentar tanto maduración nuclear como maduración citoplasmática. La mayoría de investigadores que emplean esta técnica de obtención (*post mortem*) para muestras de ovocitos de camélidos sudamericanos han informado un porcentaje de maduración nuclear ovocitaria entre 39-80% en un rango de tiempo de 24 h - 36 h, siendo un tiempo consenso 32 h para la maduración de ovocitos *in vitro* de alpaca (Ruiz et al., 2017). Con respecto a la maduración citoplasmática de ovocitos de camélidos sudamericanos no hay mucha información debido a la mayor complejidad que éste presenta, además, por esta técnica de obtención de gametos (*post mortem*) existe un desconocimiento del estado de desarrollo del folículo en el que se encuentra el ovocito empleado (Trasorras et al., 2013).

Así también, para la alpaca existe un reducido porcentaje de ovocitos maduros obtenidos mediante maduración *in vitro* (IVM), en comparación a otros animales de su misma familia resultando ser la alpaca un animal muy complejo, pero a su vez interesante de trabajar. Dicha diferencia también se podría deber a la alteración del microambiente del ovocito, provocando modificaciones a nivel genético y celular alterando así su desarrollo normal (Abd El-Aziz et al., 2016; Salhab et al., 2013). Esta traba con el tiempo será superada si se logra una buena estandarización de las tecnologías reproductivas para esta especie.

Los trabajos en alpaca, específicamente con ovocitos colectados *post mortem*, han llegado a obtener porcentajes de maduración ovocitaria *in vitro* entre 5.7% - 39.4% (Leisinger et al., 2014), siendo relativamente menores al de Huanca et al. (2014), el cual obtuvo porcentajes entre 26.3% - 75.3%. En ambas investigaciones, el traslado al laboratorio de investigación de las muestras obtenidas ha sido realizado en tiempos cortos, menor a 10 h, y a temperaturas cálidas alrededor de 37 °C. En contraste a estos trabajos, Castro (2018) obtuvo un 33.2% de maduración ovocitaria con un tiempo de traslado de la muestra de 22 h y con una temperatura de 10 °C.

2.3. Foliculogénesis: interacción ovocito - células de granulosa (CGM y CC)

El desarrollo de la gónada sexual en el embrión de mamíferos inicia entre las 3-6 semanas de concepción, llevándose a cabo importantes procesos como la diferenciación de la gónada sexual que da lugar en esta ocasión al ovario, seguido de la colonización de las células mesonéfricas que vienen a ser las precursoras de las células del folículo (Palma et al., 2012).

La foliculogénesis, es la maduración y desarrollo del folículo y se da de manera simultánea a la ovogénesis, que es el desarrollo del ovocito. La foliculogénesis abarca una secuencia de eventos que involucran regulaciones endocrinas, paracrinas y

autocrinas, con el objetivo de obtener ovocitos maduros o competentes para la fertilización y que puedan llegar a un buen desarrollo embrionario (De Figueiredo et al., 2018). Esta secuencia de eventos comprende 5 estadios: estadio del folículo primordial, folículo preantral (folículo primario, secundario y terciario), y folículo antral.

El folículo primordial en la especie humana y bovina se origina durante el desarrollo del embrión durante la gastrulación, donde las células primordiales germinales se desarrollan y dan origen al ovocito. A su vez los ovocitos se encuentran detenidos en la primera meiosis y llegan a estar rodeados de una monocapa de células aplanadas o también llamadas pregranulosas inactivas (Palma et al., 2012).

Seguidamente, viene el estadio de folículo preantral dando lugar al folículo primario que no difiere mucho con respecto al folículo primordial, solo que ahora el ovocito se encuentra rodeado por una monocapa de células de granulosa que adoptan una forma cúbica. En el folículo secundario, se pueden observar varias capas de células de granulosa de forma cúbica, las que segregan una capa glicoproteica que dará lugar a la zona pelúcida y también se forma la primera capa de la teca (Gilbert, 2005; Palma et al., 2012). El folículo terciario por su parte involucra la capacidad del ovocito para completar la meiosis, un aumento de volumen de este, formación de la zona pelúcida, proliferación de las células de granulosa, reclutamiento de las células de la teca hacia la lámina basal, y el inicio de la formación de la cavidad antral (Pedersen, 1969; citado por Hutt y Albertini, 2007).

En el folículo antral o folículo de Graaf, las células de granulosa se han diferenciado en dos tipos de células; el primer tipo se encuentra rodeando directamente al ovocito, y corresponde a las células de granulosa del cúmulo (CC) que forman el complejo cúmulo-ovocito (CCO). El segundo tipo de células de granulosa son llamadas células de granulosa murales (CGM) que recubren el interior del folículo, y se encuentran rodeadas desde el exterior por una matriz extracelular especializada llamada lámina basal (Kulus et al., 2020). Adicionalmente, existe un tercer tipo de células somáticas denominadas

células de la teca importantes para la foliculogénesis, y que tapizan el folículo y mantienen una interacción con las células de granulosa murales (Liu et al., 2017). Así mismo, en este estadio las CG tienen una influencia de la hormona LH que permitirá la reactivación de la meiosis y maduración citoplasmática que da lugar al ovocito maduro (Gilbert, 2005). Una vez completados todos estos estadios, se produce la ovulación.

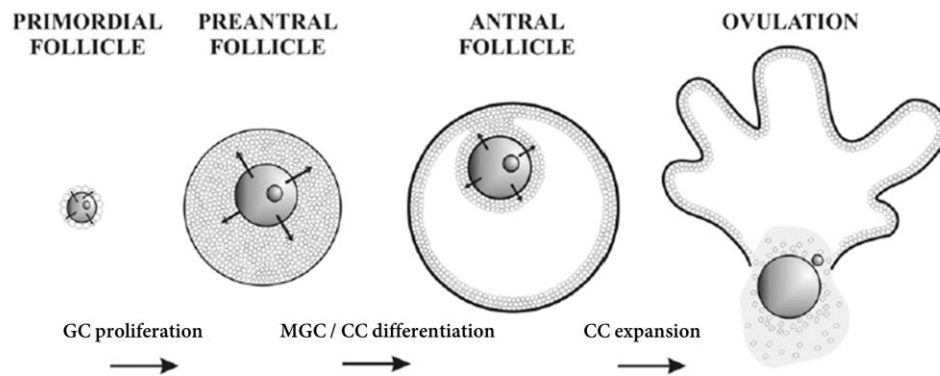


Figura 1. Desarrollo del folículo dependiente de las CGM y las CC.

(Modificado de Salustri et al., 2004)

2.4. Células de granulosa (CG)

Las CG son las células anexas más importantes asociadas al ovocito, ellas experimentan cambios morfológicos y fisiológicos durante la foliculogénesis, que abarcan la etapa de proliferación y diferenciación, además del proceso de ovulación, luteinización y atresia (Cuiling et al., 2005).

Es a partir de la década de 1930 que se evidencia que las células de la granulosa cumplen un rol importante en la maduración ovocitaria (Liu et al., 2017). En estudios realizados, como el de Buccione et al. (1990), demostraron que las células somáticas foliculares promovían la reiniciación de la meiosis y su progresión a la metafase II (maduración nuclear), así también, la competencia de ovocitos para someterse a fertilización y embriogénesis preimplantacional (maduración citoplásmica). Fue así que

las células de granulosa ya no sólo eran vistas como receptores pasivos de señales de desarrollo asociadas a los ovocitos, sino que se reconoció su papel esencial en la interacción compleja bidireccional con el ovocito (Eppig, 2001). Dentro de estos roles de interacción, tenemos que las células de granulosa influyen en el metabolismo, crecimiento, arresto meiótico y maduración del ovocito. Por otro lado, el ovocito influye en las funciones de las células de granulosa, su proliferación, diferenciación, organización folicular y expansión del cúmulus (Figura 2) (Eppig, 1991; Cuiling et al., 2005). Debido a la interacción entre estas células somáticas y la célula germinal se podría prever que las células de granulosa vendrían a ser un marcador indirecto para verificar la calidad ovocitaria (Uyar et al., 2013).

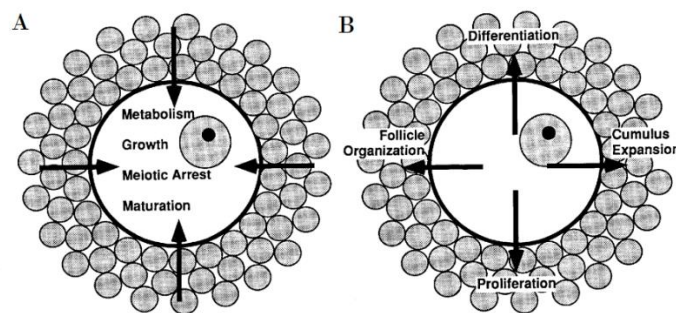


Figura 2. Interacción entre el ovocito y las células de granulosa. (A) Influencia de las células de granulosa en el ovocito. (B) Influencia del ovocito sobre las células de granulosa (Eppig, 1991).

Existen dos tipos de células de la granulosa definidas por su ubicación estructural dentro del folículo antral, siendo una de estas las células cúmulus (CC), las que son adyacentes al ovocito y que forma el CCO, y, por otro lado, las células de granulosa murales (CGM) que recubren el interior del folículo y descansan en la lámina basal (Figura 3) (Kulus et al., 2020).

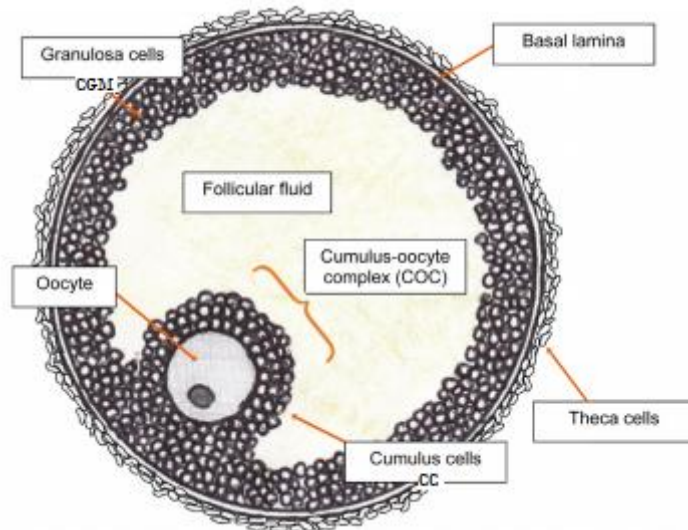


Figura 3. Folículo antral. Células de granulosa clasificadas según su ubicación estructural: CGM y CC (Modificado de Combelles y Hennet, 2013).

Aunque las CGM y CC derivan de un mismo antecesor, no solo difieren en su ubicación dentro del folículo, sino también ligeramente en su morfología, mientras que las CGM parecen formar un epitelio pseudoestratificado al estar en contacto con la lámina basal, las CC lo hacen de manera similar pero alrededor del ovocito (Eppig, 2001). Además, existe una diferencia en el perfil de expresión de miRNA entre estos, lo cual se ha observado en células de granulosa de la especie humana (Andrei et al., 2019).

De manera general, las células de granulosa son células circulares con borde irregular granular, esta granularidad se debe a que presentan gránulos o gotas lipídicas que a su vez contienen hormonas esteroideas (Aghadavod et al., 2015; Regan et al., 2018).

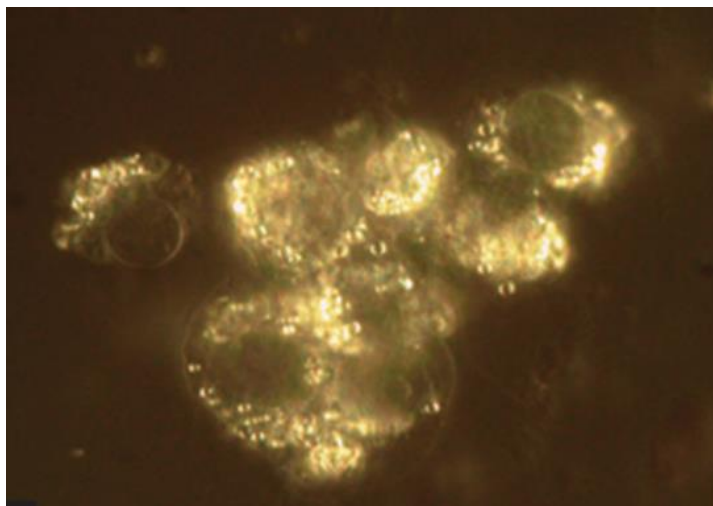


Figura 4. Morfología de las células de granulosa. Agregado de células de granulosa (Aghadavod et al., 2015).

2.4.1. Células de granulosa murales (CGM)

Las CGM descansan y se encuentran ubicadas adyacentes a la lámina basal, la lámina basal es una matriz extracelular especializada que cumple 2 funciones esenciales: primero, ser la barrera entre la capa epitelial y el tejido conectivo, y segundo, influenciar en la proliferación y diferenciación de las células de granulosa (Palma et al., 2012). El principal componente de la lámina basal del folículo ovárico es el colágeno tipo IV (Kossowska-Tomaszczuk et al., 2010), que en conjunto con otras proteínas como la laminina forman la columna vertebral de la lámina basal. El colágeno tipo IV, de los 28 tipos existentes, es el colágeno estructural más importante con un potencial de señalización clave en diversas funciones fisiológicas (Karsdal, 2019).

Las CGM presentan una interacción entre estas a través de las uniones gap que son canales transmembrana conformados principalmente por proteínas denominadas conexinas, siendo la más importante la conexina 43 (Cx43). Esta Cx43 es sintetizada por el aumento de FSH, mientras que disminuye su síntesis a medida que aumenta el LH, porque este último modifica la estructura de las Cx43 y es esta variación la que trae

como consecuencia simultánea la reanudación de la meiosis (Figura 5) (Palma et al., 2012).

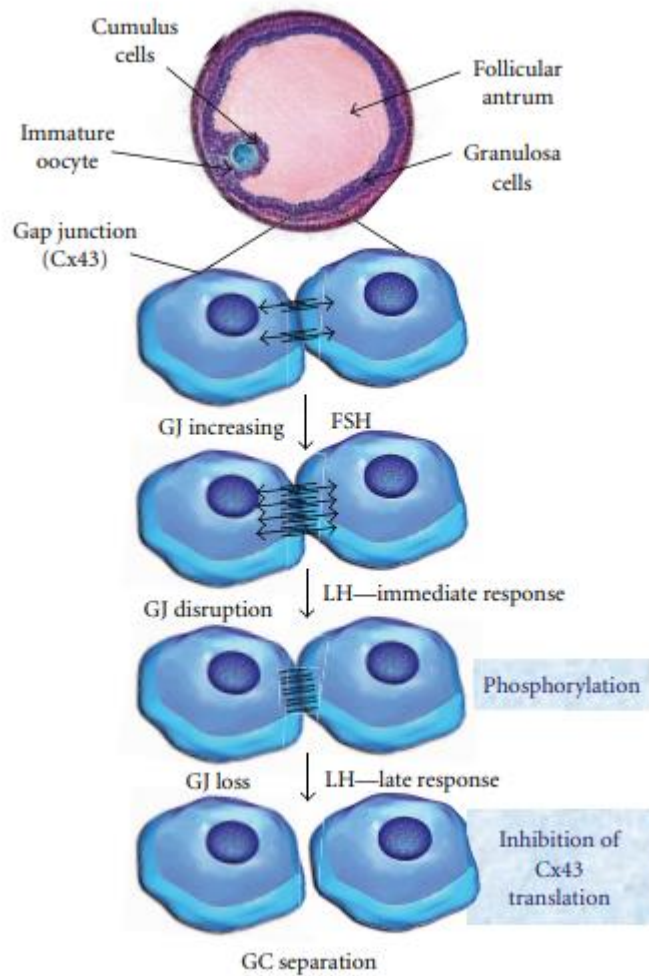


Figura 5. Comunicación CGM-CGM a través de uniones gap (Palma et al., 2012).

Así mismo, las CGM son una población heterogénea porque algunas expresan ciertas moléculas mientras que otras no, como, por ejemplo, las CGM que se encuentran más próximas a la lámina basal presentan un mayor número de receptores LH en comparación a las que están más cerca a la parte central del folículo (Eppig, 2001).

Dentro de las funciones adicionales de las CGM está la producción de progesterona que es esencial en la formación del cuerpo lúteo después de la ovulación (Kulus et al., 2020), sin embargo, después de la ovulación las CGM normalmente sufren apoptosis, pero

queda una subpoblación de células foliculares ováricas que permanecen viables y pueden ser cultivadas *in vitro* durante períodos prolongados (Kossowska-Tomaszczuk et al., 2010).

2.4.2. Células de granulosa del cúmulus (CC)

Las CC son las células anexas al ovocito y en conjunto forman el CCO. La relación basada en la comunicación entre el ovocito y las CC es tan estrecha que las CC presentan marcadores que indican la buena calidad del ovocito, como el proteoglicano Versicano presente en los humanos (Shen et al., 2020). La comunicación entre el ovocito y CC se da mediante extensiones citoplasmáticas que atraviesan la zona pelúcida y forman uniones gap con la membrana del ovocito, facilitando la comunicación y el intercambio de iones y moléculas (Kulus et al., 2020). Esta comunicación paracrina a través de proyecciones transzonales (PTZ) se puede modelar por 4 vías (Figura 6) (Albertini et al., 2001; citado por Palma et al., 2012):

1. Captación localizada de factores de crecimiento como el GDF-9 del ovocito (bola amarilla) por endocitosis en los sitios de unión de las proyecciones transzonales (PTZ) en el oolema. El transporte vectorial de vesículas endocíticas (VE) al citoplasma de las células de la granulosa se realiza a través de los microtúbulos (MT).
2. Las interacciones granulosa-zona pelúcida son necesarias para la orientación de las PTZ. Los sitios de contacto pueden jugar un papel importante en la función de señalización de los ovocitos y las células de la granulosa.
3. Las uniones gap permiten las comunicaciones intercelulares directas entre las microvellosidades del ovocito y las PTZ de células de la granulosa.
4. Vía para la liberación de factores de células de la granulosa (bola roja) empaquetados en vesículas secretoras (VS) que experimentan endocitosis a través del receptor específico en la superficie del ovocito. N: núcleo, MT:

microtúbulos, ZP: zona pelúcida, bolas rojas: factores de las células de la granulosa, bolas amarillas: factores liberados por el ovocito.

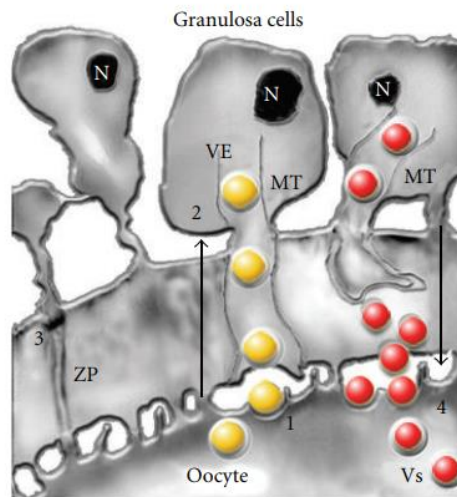


Figura 6. Vías de comunicación paracrina entre el ovocito y las CC (Palma et al., 2012).

Por su parte, la comunicación entre las CGM y las CC se da a través de las uniones gap (García, 2016) y a través de las vesículas extracelulares que se encuentran en el fluido folicular, estas vesículas transportan macromoléculas como ARNm, miARN y proteínas entre las células de granulosa (Del Collado et al., 2018).

2.5. Usos biotecnológicos de las células de granulosa

Entre las diversas aplicaciones biotecnológicas podemos reconocer desde la investigación básica, y es que las células de la granulosa se emplean en análisis moleculares para conocer los procesos básicos asociados a estas células, como, por ejemplo, en los eventos del ciclo celular durante la formación de los folículos ováricos (Kulus et al., 2020). Ello permitirá una mayor comprensión de procesos como la foliculogénesis, el desarrollo y maduración de los ovocitos.

Por otro lado, si nos enfocamos en la funcionalidad bidireccional entre el ovocito y las CG, estas células de granulosa se emplean como un suplemento en co-cultivos *in vitro*, por ejemplo, en co-cultivos durante la maduración de los ovocitos *in vitro* tanto en bovinos y humanos produciendo un aumento considerable en la tasa y calidad de la maduración de ovocitos y el posterior desarrollo embrionario de estos (Jahromi et al., 2015; Konishi et al., 1996). Así mismo, las CC como co-cultivo autólogo durante el desarrollo embrionario *in vitro* en la etapa de blastocisto ha demostrado beneficios en mujeres menores de 38 años con repetidos problemas implantacionales (Benkhalifa et al., 2012).

Además, las CG presentan cualidades de células madre, pese a que en un inicio se creía que las CG estarían diferenciadas completamente por su desarrollo hasta el estadio de folículo antral en el ovario, y a las funciones específicas propias de células especializadas que realizaba. Sin embargo, resultó ser todo lo contrario, y es así que células madre y progenitoras con actividad receptora de FSH se identificaron en poblaciones de CG luteinizantes obtenidas durante la colecta de ovocitos previo a realizar un procedimiento de reproducción asistida humana (Kossowska-Tomaszczuk y De Geyter, 2013). Así mismo, la literatura indica que las CG expresan marcadores moleculares que son característicos de las células madre mesenquimales como CD29, CD44, CD105, CD9, y también marcadores de células madre pluripotentes como Oct4, Nanog, Sox2 (Kossowska- Tomaszczuk et al., 2009). Es así que Oki et al. (2012) lograron diferenciar CGM de ovario de cerdo a osteoblastos, mientras que Varras et al. (2012) pudieron diferenciar CG de ovario humano a condrocitos. Por su parte Saadeldin et al. (2018) evidenciaron que las CC de ovocitos de folículos antrales de *Camelus dromedarius* (camello) vendrían a ser células madre multipotentes, logrando transdiferenciarlas a osteoblastos, células neuronales y adipocitos.

Debido a las características de las CG y a su técnica relativamente sencilla de obtención es que estas células pueden convertirse en un modelo para desarrollar terapias con

células madre con posible aplicación en campos como la medicina regenerativa e ingeniería de tejidos ya sea en especies animales o en humanos.

2.6. Cultivo celular *in vitro* de células animales

El cultivo celular implica el aislamiento, colecta y cultivo en un medio artificial de células obtenidas a partir de un tejido. Cabe recalcar que el medio artificial en el que se realiza un cultivo *in vitro* tiene como intención básica y primordial mimetizar el ambiente natural de donde procede la muestra de células (Kasper et al., 2018).

El cultivo de células animales se inició en el siglo XIX a partir de sumergir un explante tisular en el fluido tisular de otro animal, y poco a poco aislando células de diferente procedencia se llegaron a obtener cultivos de pocas generaciones celulares. Al ya hacer disecciones de tejidos, seguido del uso de enzimas como la tripsina, todo lo que involucraba cultivos celulares se fue haciendo mucho más sistematizado, a su vez fueron mejorando los resultados llegando a hacerse varios pasajes de las células a nuevos ambientes de cultivo que permitió un mayor crecimiento de estas (Taylor, 2014). Es así que se llegó hasta las famosas células HeLa (Henrietta Lacks), caracterizadas por ser la primera línea celular humana obtenida de una muestra de cáncer cervical el cual se logró proliferar en un laboratorio. Estas células presentan cualidades resaltantes, principalmente su fácil proliferación en medio simples lo que ha permitido mantenerla incluso hasta hoy en día y así poder hacer investigación en áreas como el cáncer (Rodríguez-Hernández et al., 2014).

Si bien los cultivos celulares ya podían mantener la propagación de diversas poblaciones celulares animales, los medios de cultivo necesitaban ser suplementados para mimetizar el ambiente original de las células que eran cultivadas, es así que se desarrollaron medios químicos nutritivos basales disminuyendo el porcentaje de suero o fluido de tejidos. Un logro trascendental fue el desarrollo de la criopreservación celular, y de esa manera ya no se tuvo que mantener un cultivo continuo, sino más bien se

buscó almacenarlo hasta el momento que sea necesario realizar un nuevo cultivo de dichas células (Kasper et al., 2018).

Al ser el cultivo celular una herramienta muy útil y reproducible tiene diversas aplicaciones en la bioquímica, biología celular y molecular. Resaltan en el estudio de carcinogénesis y análisis de enfermedades e investigación de estas mediante la manipulación genética de líneas celulares (INVITROGEN, 2014; Rodríguez-Hernández et al., 2014).

2.6.1. Factores que influyen en el cultivo celular *in vitro*

2.6.1.1. Bioseguridad

Trabajar con células animales en el laboratorio implica una exposición a diferentes patógenos, virus, entre otros. Es por ello que se necesita que el personal tome las precauciones de seguridad, y hoy en día existen diferentes protocolos de bioseguridad dependiendo del tipo de investigación que se realice y el tipo de muestra con la que se trabaje (Philippeos et al., 2012).

2.6.1.2. Sustrato

Existen células cultivadas *in vitro* que crecen en suspensión, como por ejemplo las células hematopoyéticas, en contraste a estas existen otras que necesitan de un sustrato artificial como soporte o scaffold que mimetice su ambiente natural para poder crecer, dentro de estos sustratos se tiene al colágeno tipo IV y a la gelatina. El sustrato le brinda soporte de adhesión a la célula, así como también las condiciones necesarias para poder proliferar (Rodríguez-Hernández et al., 2014).

2.6.1.3. Medio basal

El medio base de un cultivo *in vitro* va a variar y depender del tipo de célula que se desea cultivar, siendo en su mayoría libres de suero. Por ejemplo, para la maduración *in vitro* de ovocitos el medio usado frecuentemente es el Medio 199 (TCM 199), mientras que en el caso de las células de granulosa puede ser el Medio MEM (Minimum Essential Medium) o DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium). Al ser los medios

basales libres de suero, se busca suplementar los medios de cultivo con factores definidos que replacen a este (Al-Rubeal, 2015).

2.6.1.4. Suplementos del medio de cultivo

Aminoácidos y Vitaminas: Los aminoácidos esenciales son importantes al igual que los no esenciales como la cisteína, arginina y glutamina. En el caso de las vitaminas, estos son incluidos dentro de medio basal como el medio MEM, pero se puede suplementar con el suero. Tanto la cantidad y el tipo de los aminoácidos como las vitaminas pueden variar de acuerdo al tipo de célula a cultivar (Rodríguez-Hernández et al., 2014).

Hormonas: Pueden obtenerse del suero o también de manera independiente, entre las hormonas resaltantes para la maduración ovocitaria tenemos al FSH (Hormona folículo estimulante), LH (Hormona luteinizante), y estradiol (Rodríguez-Hernández et al., 2014).

Factores de crecimiento: Entre estos destacan el EGF (Factor de crecimiento epidérmico) con potencial mitogénico, y el IGF (Factor de crecimiento insulínico) debido a que insulina estimula la síntesis de ADN que es esencial para el crecimiento y ciclo mitótico (Al-Rubeai, 2015).

Suero: Es obtenido del sobrenadante de la sangre coagulada de bovinos o equinos, y es rico en nutrientes, factores de crecimiento, hormonas, elementos protectores, entre otros que no son encontrados en el medio basal. Sin embargo, existen algunas desventajas en su uso como que su composición es variable de un lote a otro lo que alteraría los resultados considerablemente, su alto contenido proteico, posible potencial de contaminación por virus o micoplasma atribuidos al animal de procedencia, su alto costo, y, además, el debate ético al ser obtenidos de fetos bovinos (Al-Rubeai, 2015).

2.6.1.5. pH, CO₂ y temperatura

El pH puede variar de acuerdo al tipo de célula, en mamíferos oscila entre 7 – 7.4. El CO₂ puede tener un impacto en el pH, suele oscilar entre el 4-10%. La temperatura

varía de acuerdo al tipo de células, pero en mamíferos dicha variación es entre 35– 39 °C (Rodríguez-Hernández et al., 2014).

2.6.1.6. Antibióticos y antifúngicos

Son empleados en la preparación del medio con el objetivo de reducir la probabilidad de contaminación del cultivo por bacterias u hongos, dentro de estos tenemos a la estreptomycinina y penicilina sódica (Rodríguez-Hernández et al., 2014).

2.6.2. Tipos de cultivo celular

2.6.2.1. De acuerdo al tiempo de duración del cultivo

Cultivo primario: Es el cultivo inmediato luego de disgregar y aislar las células de un tejido. El cultivo se realiza de acuerdo a las condiciones y requerimientos del tipo de células correspondiente, y se considera que es un cultivo primario hasta que las células se subcultiven (Tavira et al., 2009).

Subcultivo: Debido a la confluencia de las células se realizan transferencias (PASAJES) de estos a nuevos ambientes artificiales. Si las células son adherentes se tendrá que emplear una enzima de apoyo como la tripsina; si por el contrario las células crecen en suspensión, simplemente se colecta la suspensión y después de lavados se lo transfiere a un nuevo ambiente (Philippeos et al., 2012).

Cultivo de línea celular: Después del primer subcultivo, el cultivo primario se conoce como línea celular y tiene un tiempo de vida limitado. A medida que se realizan los pasajes las células que posean buena capacidad de crecimiento predominarán y se obtendrá una uniformidad genética y fenotípica (INVITROGEN, 2014).

Cultivo celular continuo: Las células se immortalizan y su cultivo se realiza sin pérdidas viales considerables (INVITROGEN, 2014).

2.6.2.2. De acuerdo a las dimensiones del cultivo

Si bien a lo largo de estos años se han desarrollado cultivos celulares en placas, lo que se conoce como cultivo en dos dimensiones o **cultivo 2D** que busca evaluar

principalmente la plasticidad de las células a cultivar, este no considera la morfología y fisiología del tejido original de procedencia de dichas células. Es por ello que actualmente se viene desarrollando tecnologías enfocadas en mimetizar aún más al ambiente *in situ* de procedencia de dichas células con el fin de no solo enfocarse en la plasticidad celular, sino también en la posible vascularización del órgano original de procedencia, y, en consecuencia, se vienen desarrollando cultivos en tres dimensiones o también conocidos como **cultivo 3D**.

Las células de la granulosa normalmente se cultivan en monocapas (2D), sin embargo, en estas condiciones las CG van perdiendo poco a poco sus características, como, por ejemplo, el receptor de la hormona folículo estimulante (FSH) (Kossowska-Tomaszczuk et al., 2010). Por ello, se han venido desarrollando tecnologías de cultivo 3D (empleando soporte/scaffold/andamio) con el fin de optimizar las condiciones de cultivo de estas células creando un entorno más real del desarrollo de los folículos ováricos *in situ*, ayudando a mejorar su autoorganización, proliferación y funciones endocrinas. El diseño 3D eventualmente tendrá mucho potencial tanto para la medicina reproductiva como para la investigación del desarrollo folicular. Una estructura tipo folículo 3D es una suma del factor físico como la matriz 3D, factor biológico que son las células vivas y el factor químico que son las moléculas que secreta la célula, y todo eso crea un ambiente mimético al folículo *in vivo* (Luyckx et al., 2014). Es así que Yadav et al. (2018) mediante la técnica de gota pendiente pudo recrear un ambiente mucho más semejante al del entorno intrafolicular con el objetivo de cultivar células de granulosa murales, llegando a conservar el fenotipo de las células de granulosa *in vivo*. Usando un andamio más sofisticado Kossowska-Tomaszczuk et al. (2010) desarrollaron cultivos con matriz 3D de sustrato de colágeno para células de granulosa luteinizantes humanas con resultados satisfactorios, logrando mantener un cultivo prolongado hasta 40 días. Por su parte, Colombo et al. (2019) en animales domésticos como el gato obtuvieron resultados

notables en cuanto a la capacidad estereogénica de las células de granulosa, realizando cultivos 3D de estos usando micro cápsulas de alginato de bario.

Se puede evidenciar que existe una gran diversidad de soportes o andamios que se pueden emplear para realizar un cultivo 3D, pero el diseño de estas dependerá de la estructura que se quiera mimetizar ya que debe permitir la comunicación célula-célula, migración, proliferación y diferenciación de las células a cultivar (Bružauskaitė et al., 2016).

2.6.3. Tipos de morfología de célula cultivadas

De acuerdo a su morfología, principalmente las células de mamífero no germinales cultivadas se pueden dividir en 3 tipos celulares (INVITROGEN, 2014; Tavira et al., 2009):

2.6.3.1. *Tipo fibroblástico:*

Con morfología alargada, bipolar o multipolar (en relación a sus ramificaciones). Crecen adheridas al sustrato (Figura 7.A.).

2.6.3.2. *Tipo epitelial:*

Con morfología poligonal regular. Crecen adheridos al sustrato (Figura 7.B.).

2.6.3.3. *Tipo linfoblástica:*

Con morfología esférica. Es común que crezcan en suspensión (Figura 7.C.).

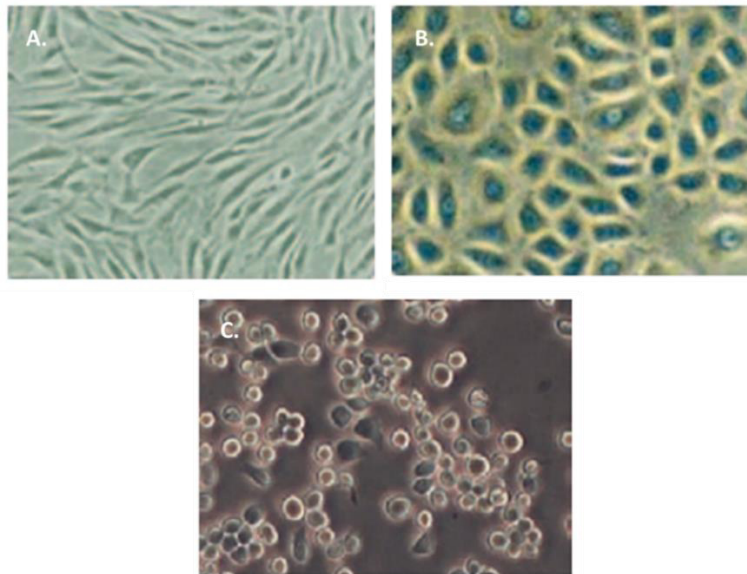


Figura 7. Morfología de células cultivadas *in vitro*: A. Tipo fibroblástico. B. Tipo epitelial. C. Tipo linfoblástica. (INVITROGEN, 2014).

2.7. Fertilización *in vitro* (FIV)

La fertilización *in vitro* es una técnica de reproducción asistida en el que los gametos sexuales (ovocito y espermatozoide) son recuperados de los progenitores para luego pasar por un proceso de preparación de estos, es decir, de maduración ovocitaria *in vitro* y capacitación espermática (es competente para la reacción acrosomal y atravesar la zona pelúcida y el oóforo del ovocito maduro) (Puga et al., 2018). Uno de los métodos *in vitro* más empleados para capacitar a los espermatozoides es el *swim up*, este se basa en diferenciar a los de mejor calidad centrándose en su movilidad debido a que representaría un factor importante para el éxito de la fertilidad (Bongso et al., 1989; citado por Magdanz et al., 2019). El *swim up* como lo describe su propio nombre consiste en el nado a través de una columna de medio capacitante, los espermatozoides son colocados en la parte baja de la columna y los que pueden migrar a la parte superior serán los más aptos para ser usados en diversos procesos de reproducción (Magdanz et al., 2019). Una vez que se encuentren listos los gametos, ovocitos y espermatozoides, son colocados juntos en un cultivo en una placa Petri, que post fertilización se obtendrá

un embrión que se empezará a dividir y desarrollar hasta cierto estadio, todo eso en condiciones que buscan mimetizar el ambiente *in vivo*. Luego, el embrión será transferido al útero del progenitor femenino, lugar donde se implantará y se desarrollará como si fuera un embarazo normal (Gilbert, 2005).

El estudio del FIV se inició en mamíferos alrededor de 1950, sin embargo, para 1978 el fisiólogo Robert Edwards marcaría un hito y el gran reconocimiento de esta técnica. Es así que el nacimiento de Louise Brown, la primera bebe probeta en el mundo marcaría un antes y un después no solo por el reconocimiento esta nueva técnica de reproducción asistida, sino también, porque generó mayores desafíos tanto nivel científico como ético (Biggers y Racowsky, 2018). Es a partir de estos desafíos generados que esta técnica ha ido mejorando hasta hoy en día y su avance ha sido a un ritmo exponencial, tanto así que en un inicio la tasa de éxito era de un solo dígito y hoy en día es alrededor del 50% en mujeres menores de 35 años, independientemente del caso particular de cada una (Eskew y Jungheim, 2017). Pero esta técnica no solo se ha desarrollado en humanos, sino también en otras especies con problemas reproductivos como el caso de las alpacas que poseen varias características que hace que sea una especie crítica (Castro, 2018; MINAGRI, 2017).

2.8. Desarrollo embrionario *in vitro*

El desarrollo embrionario abarca desde las primeras divisiones posterior a la fecundación. Y como todo tiende a mejorar, los medios de desarrollo embrionario se han ido perfeccionando suplementándose con nutrientes, aminoácidos y factores de crecimiento. Lo que permitió hoy en día evaluar el desarrollo embrionario *in vitro* hasta el estadio de blastocisto, y de esa manera tener mayor seguridad de la calidad de los embriones que se producen (Eskew y Jungheim, 2017).

El desarrollo embrionario en mamíferos abarca desde la división a dos células, 4 células, 8 células, mórula y blástula (Gilbert, 2005). En el caso de las alpacas, el desarrollo

embrionario comprende alrededor de 7 días, con lo que se obtienen estadíos de mórulas (Mamani, 2019) y blastocistos iniciales a partir del día 5 post fecundación (Pérez et al. 2017).

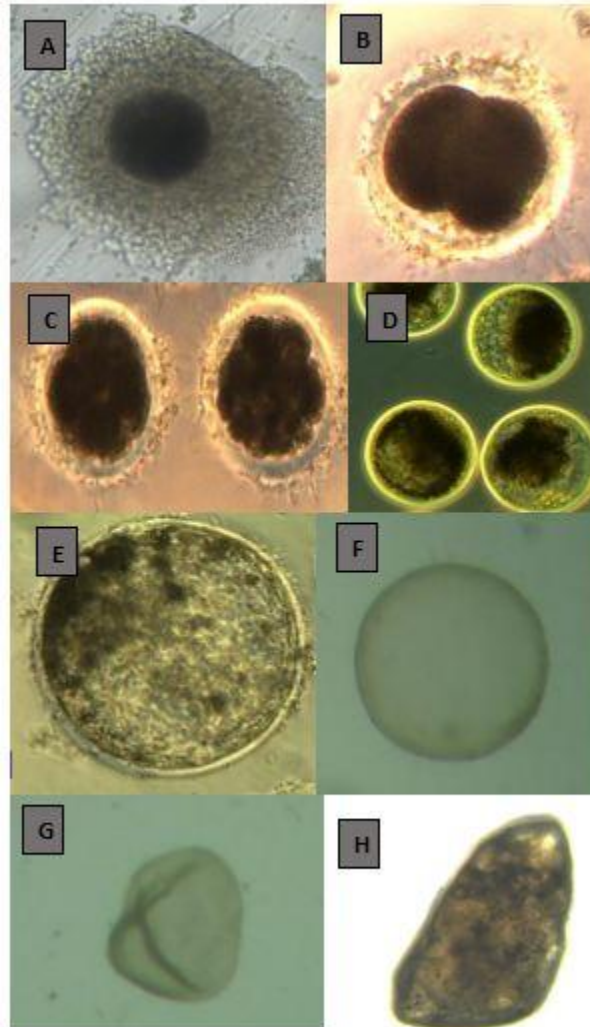


Figura 8: Estadíos del desarrollo embrionario de la alpaca.

A. Ovocito categoría 1, B. Embrión en primera división, C. Mórula compacta, D. Blastocisto inicial, E. Blastocisto expandido, F. Blastocisto eclosionado, G. Blástula, H. Blastocisto colapsado. Observación a 200X. (Pérez et al., 2017).

2.9. Partenogénesis y activación química

La partenogénesis es una estrategia de reproducción para la producción de un embrión a partir de un ovocito sin la intervención de los espermatozoides (Vallejo et al., 2003).

En el caso de mamíferos esto no es posible naturalmente, sin embargo, esto se puede dar de manera artificial mediante la activación química partenogenética del ovocito, siendo capaz este de resultar en el desarrollo embrionario temprano hasta el desarrollo temprano del feto (Kaufman et al., 1997; citado por Bos-Mikich et al., 2016). Este desarrollo no sigue encaminado debido a la ausencia de material génico que proporciona el espermatozoide (Mcgrath y Solter, 1984: citado por Bos-Mikich et al., 2016).

Existen dos métodos principales para inducir partenogénesis, el método físico y el método químico. El método físico implica la estimulación mecánica, térmica y eléctrica. Por otro lado, el método químico emplea enzimas, soluciones hipertónicas o hipotónicas, e inhibidores de síntesis de iones y proteínas (Han y Gao, 2013). La activación química partenogenética del ovocito consiste en simular lo que ocurre después de ser fertilizado por el espermatozoide, presentando efectos característicos como la reanudación de la meiosis, formación de los pronúcleos, y oscilaciones de calcio (Vallejo et al., 2003). Estos acontecimientos también pueden ser producidos sobre el ovocito en presencia de sustancias químicas como la Ionomicina que genera una elevación el calcio intracelular, y el 6 – Dimetilaminopurina (6-DMAP) que inactiva el factor promotor de maduración (FPM) y reactiva la meiosis. El tiempo de exposición y la concentración para cada una de estas sustancias pueden variar de acuerdo a las especies (Ruiz, 2008).

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.1. Hipótesis

Es posible cultivar *in vitro* las células de granulosa de *Vicugna pacos*, las cuales en co-cultivo con los ovocitos interactúan con estos, ayudan a mejorar la maduración ovocitaria y su posterior desarrollo embrionario en alpaca.

3.2. Variables

Variable independiente:

- Tiempo de cultivo
- Tipo de célula de granulosa (CGM o CC)

Variable dependiente:

- Concentración celular
- Vitalidad celular
- Maduración ovocitaria
- Desarrollo embrionario

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Cultivar células de granulosa murales y de cúmulus, y determinar el efecto de su co-cultivo *in vitro* en la maduración ovocitaria y posterior desarrollo embrionario de alpaca (*Vicugna pacos*).

4.2. Objetivos específicos

- Cultivar *in vitro* las células de granulosa murales y las células de granulosa del cúmulus de alpaca.
- Analizar el efecto *in vitro* de las células de la granulosa murales y las células de granulosa del cúmulus sobre la maduración ovocitaria de alpaca.
- Determinar el efecto derivado *in vitro* de las células de la granulosa murales y las células de granulosa del cúmulus sobre el desarrollo embrionario de ovocitos de alpaca co-cultivados con estas células.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Lugar de estudio

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú, durante los meses de junio del 2019 a marzo del 2020.

5.2. Materiales

5.2.1. Material biológico

Los ovarios y testículos de alpaca de la raza Huacaya fueron obtenidos del camal municipal de la ciudad de Huancavelica, región Huancavelica, Perú (4050 msnm, temperatura promedio anual 8 – 10 °C), y se utilizó un total de 522 ovarios y 3 epidídimos. Ningún animal recibió tratamiento hormonal antes de su beneficio.

5.2.2. Medios de cultivo y reactivos

- Transporte: En solución salina al 0.9% suplementado con antibióticos, penicilina sódica (P3032 Sigma-Aldrich) y estreptomina (S9137 Sigma-Aldrich), el cual se mantuvo a 10 °C mediante el uso de gel-packs y una caja termo-aislante.
- Lavado de muestra biológica: Agua corriente y PBS: Cloruro de sodio (S5886 Sigma-Aldrich), cloruro de potasio (P9333 Sigma-Aldrich), fosfato de potasio (P5379 Sigma-Aldrich) y fosfato dibásico de sodio (S5136 Sigma-Aldrich), suplementado con antibióticos, penicilina sódica 0.075 g/L (P3032 Sigma-Aldrich) y estreptomina 0.075 g/L (S9137 Sigma-Aldrich).
- Lavado y aislamiento de los ovocitos: Medio base Dulbecco (D5773 Sigma-Aldrich) suplementada con cloruro de calcio (C1016 Sigma-Aldrich), penicilina sódica 0.075 g/L (P3032 Sigma-Aldrich), estreptomina 0.075 g/L (S9137 Sigma-Aldrich) y heparina sódica 0.2% (laboratorio Sanderson 5000 UI/mL). El segundo medio de lavado, tiene como base el Medio 199 con

HEPES (M2520 Sigma-Aldrich), suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB) (F4135 Sigma-Aldrich) y albúmina sérica bovina 0.1% (BSA) (A3311 Sigma-Aldrich).

- Lavado de las células de granulosa (CGM y CC): Medio base Dulbecco (D5773 Sigma-Aldrich) suplementado con cloruro de calcio (C1016 Sigma-Aldrich), penicilina sódica 0.075 g/L (P3032 Sigma-Aldrich), estreptomina 0.075 g/L (S9137 Sigma-Aldrich) y heparina sódica 0.2% (laboratorio Sanderson 5000 UI/mL).
- Medio de purificación de las células de granulosa murales: Una columna de purificación con Percoll PLUS (E0414 Sigma-Aldrich) y medio Dulbecco (D5773 Sigma-Aldrich), en una proporción 1:1.
- Matriz para el cultivo de las células de granulosa (CGM y CC): Gelatina Tipo B de Bovino (G9391 Sigma-Aldrich) se disolvió en agua ultra pura de calidad Milli-Q® en una concentración de 0.2%. Se esterilizó el medio líquido obtenido, 4 h antes de su incubación en placas de 12 pocillos.
- Medio de cultivo de las células de granulosa (CGM y CC): Medio base, el medio esencial mínimo (MEM) con L-glutamina (2 mM), suplementado con bicarbonato de sodio (0.084%) (M4655 Sigma-Aldrich), albúmina sérica bovina 0.1% (BSA) (A3311 Sigma-Aldrich), aminoácidos no esenciales 1% (M7145 Sigma-Aldrich), L-glutamina 2 mM (G8540 Sigma-Aldrich), factor de crecimiento epidérmico EGF 10 ng/mL (E9644 Sigma-Aldrich), factor de crecimiento de fibroblastos-2 10 ng/ml (FGF-2) (SRP4037 Sigma-Aldrich), factor de crecimiento insulínico 25 ng/ml (I3769 Sigma-Aldrich) y gentamicina 1mg/ml (G1264 Sigma-Aldrich), penicilina sódica 100UI (P3032 Sigma-Aldrich), estreptomina 0.1 mg/ml (S9137 Sigma-Aldrich), FSH 20 ng/ml (Folltropin-V), Androstenediona 2 mM (A075 Sigma-Aldrich) (Modificado de Quinn et al., 2006; Yenuganti y Vanselow, 2017; Saadeldin et al., 2018).

- Medio de maduración ovocitaria: Medio base el Medio 199 (M2520 Sigma-Aldrich), diluido en agua ultra pura de calidad Milli-Q® y suplementado FSH 1.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Folltropin-V), eCG 10 UI/mL (Novormon), estradiol 17 β 0.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (E4389 Sigma-Aldrich), piruvato de sodio 0.2 mM (P5280 Sigma-Aldrich), factor de crecimiento epidérmico 50 ng/mL (EGF) (E9644 Sigma-Aldrich), albúmina sérica bovina 4 mg/mL (BSA) (A3311 Sigma-Aldrich), gentamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (G1264 Sigma-Aldrich) y suero fetal bovino al 10% (SFB) (F4135 Sigma-Aldrich).
- Medio de aislamiento y selección espermática: Medio base HAM F-10 (N6635 Sigma-Aldrich), suplementado con lactato de calcio (L4388 Sigma-Aldrich), bicarbonato de sodio (S5761 Sigma-Aldrich), penicilina sódica 0.075 g/L (P3032 Sigma-Aldrich), estreptomina 0.075 g/L (S9137 Sigma-Aldrich), y albúmina sérica bovina 4 mg/mL (aislamiento) y 15 mg/mL (selección espermática) (BSA) (A9418 Sigma-Aldrich).
- Fertilización *In Vitro*: Medio base Ham-F10 (N6635 Sigma-Aldrich), suplementado con PHE 40 uL/mL ((Penicilamina 2 mM (P4875 Sigma-Aldrich), Hipotaurina 1 mM (H1384 Sigma-Aldrich) y Epinefrina 250 μM (E4250 Sigma-Aldrich)), heparina sódica 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (laboratorio Sanderson 5000 UI/mL) y albúmina sérica bovina 15 mg/mL (BSA) (A9418 Sigma-Aldrich).
- Cultivo de embriones: Medio base KSOM+ aa (MR-106-D Merck) suplementado con 10 % SFB (F4135 Sigma-Aldrich), piruvato de sodio 2 mM (P5280 Sigma-Aldrich) y gentamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1264 Sigma-Aldrich).
- Activación química: Incubaciones en medio KSOM+ aa (MR-106-D Merck), ionomicina 5 μM (I0634 Sigma-Aldrich) y 6-DMAP 2 mM (D2629 Sigma-Aldrich).

Todos los medios de cultivo fueron filtrados con filtros de membrana de 0.22 μm (Millex-GV Merck) y solo en el caso de los cultivos de gametos y embriones se cubrieron con aceite mineral (LifeGuard Oil).

5.2.3. Equipos y materiales de laboratorio

5.2.3.1. Equipos

- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Centrifuga de microtubos de 1.5 mL
- Estereoscopio
- Estufa
- Incubadora de CO₂
- Micropipetas
- Microscopio de luz
- Microscopio invertido con accesorios para micromanipulación Narishigue
- Plancha termo-controlada
- Refrigeradora
- Sistema de purificación de agua

5.2.3.2. Materiales de laboratorio

- Agujas 21G
- Bulbos de goma para pipetas
- Cajas de Tecnopor
- Cámara de Neubauer
- Coladores de metal

- Filtros de membrana de 0.22 μm (Millex-GV Merck)
- Gel-packs
- Jeringas de 1, 10 y 20 mL
- Laminillas
- Láminas
- Pinzas con diente
- Pipetas pasteur de plástico
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Placas Corning™ (353001)
- Placas de cultivo Falcon para ICSI (351006)
- Placa de cultivo Falcon 60 x 15 mm (353652)
- Placas de 6 y 12 pocillos (Corning 3516)
- Placas Petri de vidrio
- Tijeras
- Tips de 10 μL , 100 μL y 1000 μL
- Tubos de centrifuga de 1.5 mL, 0.6 mL y 0.2 mL
- Tubos Falcon de 15 mL y 50 mL
- Vasos de precipitado

5.3. Métodos

5.3.1. Colecta y traslado de la muestra biológica

Las muestras biológicas (ovarios y testículos) fueron colectadas en el camal municipal de la ciudad de Huancavelica (Perú). Las muestras biológicas fueron transportadas en una solución de NaCl 9% a 10 °C al Laboratorio de Fisiología de la Reproducción (LFR), Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM, y llegaron en un periodo aproximado de 22 h - 24 h después del beneficio del animal.

Hubo una única muestra de ovarios de alpaca que fueron trasladados a 38 °C, del cual solo se cultivó *in vitro* las CC. Su procedimiento fue el mismo que el de las muestras trasladadas a 10 °C.

5.3.2. Lavado de la muestra biológica

Una vez llegada la muestra al laboratorio se lavaron los ovarios 2 veces con buffer fosfato salino (PBS) suplementado con penicilina y estreptomina a temperatura ambiente.

5.3.3. Aspiración y colecta del fluido folicular (FF)

Luego del lavado de los ovarios, cada folículo con un tamaño de diámetro de 2-8 mm fue aspirado con una aguja 21G unida a una jeringa de 10 mL. El FF aspirado de los folículos se colocó en un tubo Falcon de 15 mL, y se dejó sedimentar en la incubadora a 38.5 °C por 10 min hasta la formación de un *pellet*.

5.3.4. Aislamiento y lavado de los ovocitos

El *pellet* fue colocado en pequeñas proporciones en una placa de 6 pocillos que contenía medio de lavado Dulbecco, en cada pocillo se observaron células somáticas y también ovocitos. Luego, los ovocitos con características idóneas que estuvieron en la categoría 1 y 2 (Castro, 2018; Stojkovic et al., 2001), se trasladaron a gotitas de lavado que tenía Medio 199 suplementado con HEPES, para continuar con 2 lavados más.

El complejo cúmulus-ovocito se clasificó en 4 categorías (Castro, 2018; Stojkovic et al., 2001):

Categoría 1: CCO con más de 5 capas de CC, citoplasma del ovocito oscuro y homogéneo.

Categoría 2: CCO con menos de 5 capas de CC, citoplasma del ovocito oscuro y homogéneo.

Categoría 3: CCO con CC menos compactas, citoplasma del ovocito no homogéneo o vacuolado.

Categoría 4: CCO con CC disgregado o sin CC, citoplasma del ovocito con pigmentación heterogénea.

5.3.5. Aislamiento y lavado de las células de granulosa

Las CGM que se quedaron en los pocillos con Dulbecco fueron recuperadas en microtubos de 1.5 mL, y se lavaron 2 veces con medio Dulbecco con una centrifugación a 1000 g por 5 min. Luego, se realizó un proceso enzimático usando hialuronidasa líquida agregando entre 300 - 500 uL de esta enzima líquida al *pellet* obtenido del lavado anterior, simultáneamente se realizó una agitación mecánica durante 3 min y luego se centrifugó a 1000 g por 3 min. Seguidamente, se hicieron 2 lavados con una centrifugación a 1000 g por 5 min, y lo obtenido se diluyó en un volumen de 300 - 500 µL de medio Dulbecco al que se denominó solución de pre purificación. Posteriormente, se realizaron evaluaciones de vitalidad y concentración, enseguida se pasó a la purificación (Figura 9).

Por otro lado, para las CC solo se realizó un lavado con medio Dulbecco luego de su recuperación (post maduración *in vitro* del CCO) para quitar los restos de hialuronidasa utilizada en la denudación de los ovocitos, ello con una centrifugación de 1000 g por 5 min, y en seguida estas CC fueron cultivadas.

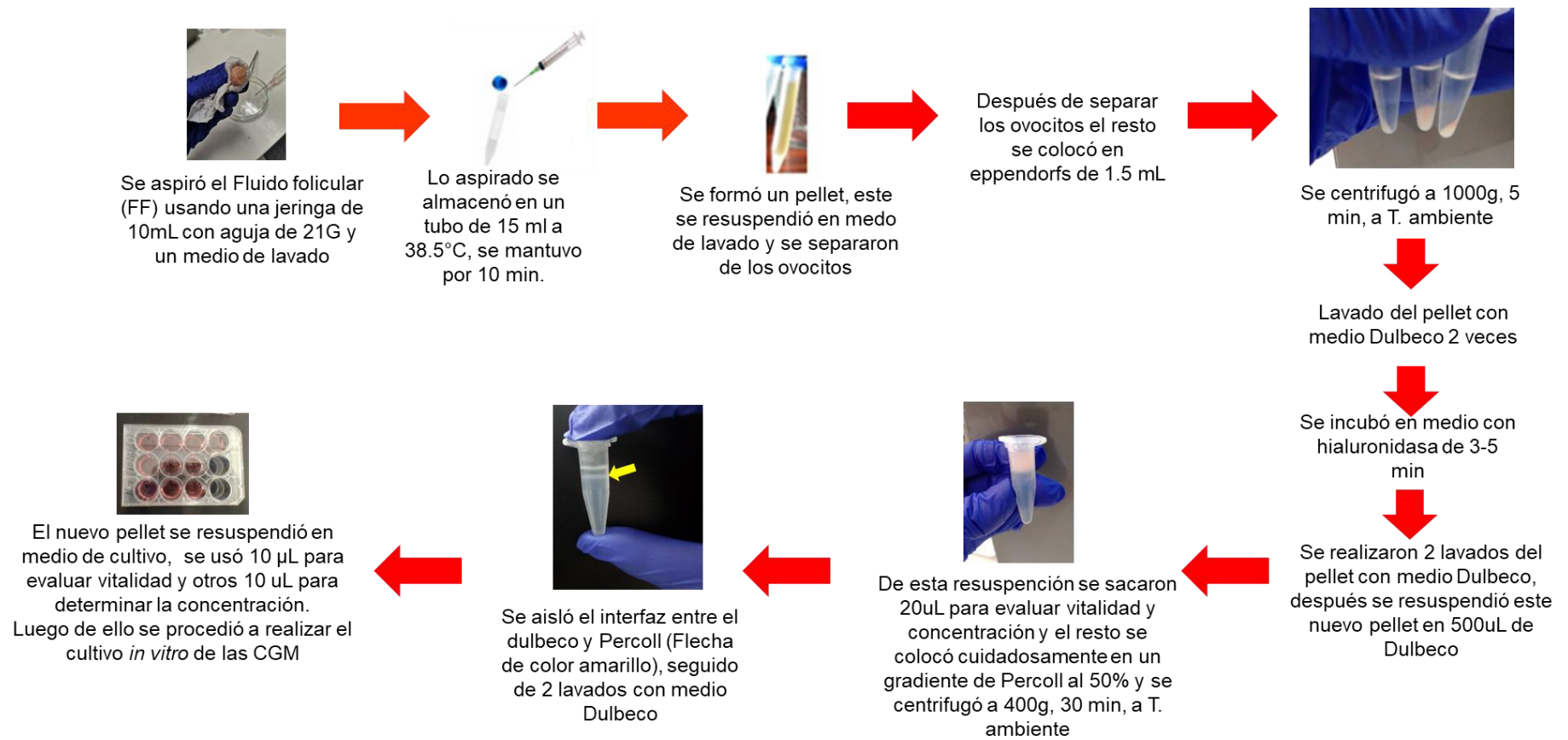


Figura 9. Flujo de trabajo. Aspiración y colecta del fluido folicular. Aislamiento, purificación y cultivo de las CGM de alpaca.

5.3.6. Evaluación de la vitalidad y concentración de las células de granulosa

Tanto la vitalidad como la concentración celular de las CGM se evaluaron antes y después de la etapa de purificación, y al inicio, durante y al finalizar el periodo de 6 a 7 días de los cultivos *in vitro*. En cada evaluación se usaron 10 μL de muestra con 2 μL de azul de tripán como colorante vital para evaluar la vitalidad de las células, siendo las células muertas las que se colorearon de azul (Figura 10). Así mismo, para evaluar la concentración celular se usaron otros 10 μL de muestra que se diluyeron en 90 μL de Dulbecco, seguidamente se colocaron 10 μL de dicha dilución en una cámara de Neubauer para realizar el respectivo conteo multiplicando lo obtenido en las cuadrículas por un millón (Figura 11).

En el caso de las CC, y debido al número reducido de estas posterior al lavado, se realizó la evaluación de vitalidad y concentración a partir de las 24 h de ser cultivadas.

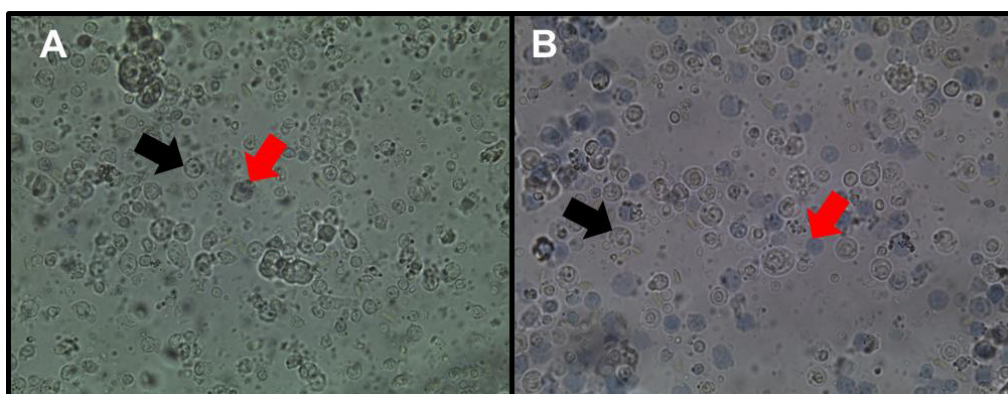


Figura 10. Vitalidad de las células de granulosa murales: A. Vitalidad previo a la etapa de purificación, B. Vitalidad de las CGM previo a su cultivo. Las flechas de color negro señalan a las células vivas, y las flechas de color rojo a las células muertas.

Observación a 400X.

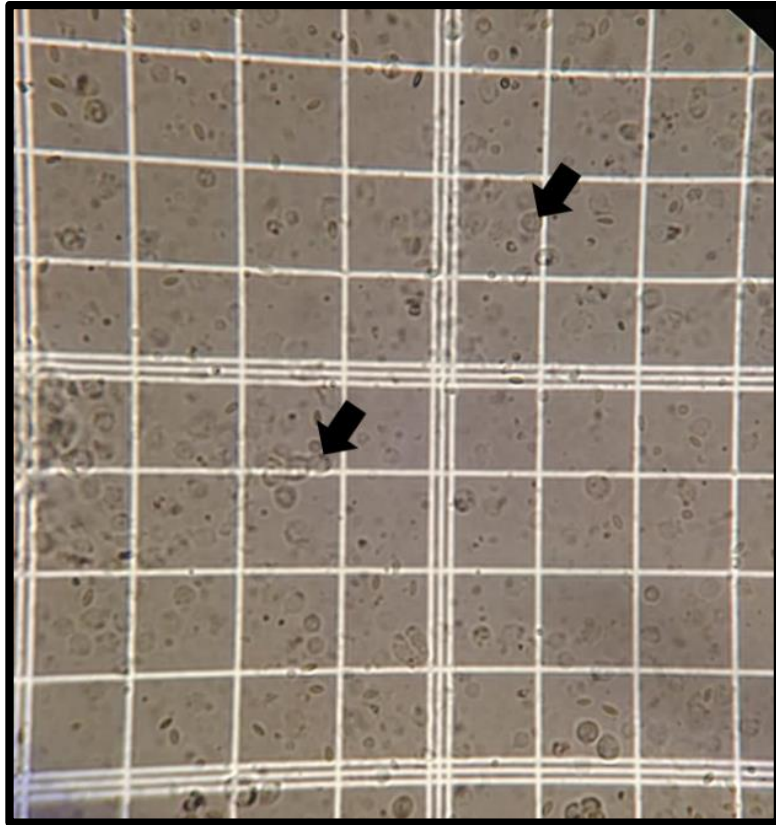


Figura 11. Células de granulosa murales en una cámara de Neubauer, previo a la etapa de purificación. Observación a 400X.

5.3.7. Purificación y post lavados de las células de granulosa murales

En esta etapa, la purificación de las CGM se realizó usando un gradiente de Percoll al 50% en un microtubo, que consistió en una mezcla de 50% de Percoll y 50% de medio Dulbecco, denominándose a esto como columna de purificación. Sobre la columna, se colocó lenta y suavemente la solución de pre purificación, que contenía a las CGM con otras células en medio Dulbecco, y se centrifugó a 400 g durante 30 min a temperatura ambiente. Se obtuvo una interfaz de color blanquecino entre la columna de purificación y la solución de pre purificación, ese halo blanquecino vendría a ser las CGM puras que luego se pasaron a otro microtubo. Seguidamente se hicieron 2 lavados con medio Dulbecco con centrifugación de 1000 g por 5 min (Modificado de Aghadavod et al., 2015) (Figura 9).

5.3.8. Medio de cultivo de las células de granulosa

Con mínimo 12 horas de anticipación, en cada pocillo de una placa de cultivo de 12 pocillos se preparó una monocapa de gelatina al 0.2% que se incubó a 38.5 °C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂. Transcurrido el tiempo se descartó el líquido sobrante y se realizaron lavados con medio Dulbecco, se dejó secar la placa de cultivo a 38.5 °C por 2 h. Una vez seca la placa, en cada pocillo se agregó 1mL de medio MEM suplementado y estabilizado previamente. Seguidamente 1x10⁵ de células de granulosa fueron cultivadas. La alimentación del cultivo de CG se realizó cada 2 días y los pasajes se realizaron de acorde al crecimiento de estas durante 144 h - 168 h.

De la única muestra de ovarios trasladada a 38 °C (Temperatura cálida), se aislaron las células de granulosa del cúmulus post maduración ovocitaria *in vitro*, y estas CC se cultivaron de manera similar a las trasladadas a 10 °C como se explica en el párrafo anterior. Este cultivo se monitoreó por 264 h, únicamente evaluando su morfología y crecimiento celular a través de la visualización de los cultivos.

5.3.9. Co-cultivo de las células de granulosa y el CCO, durante la maduración ovocitaria *in vitro*

Previo al co-cultivo, las células de granulosa obtenidas luego de un periodo de cultivo *in vitro* se lavaron con medio Dulbecco, con una centrifugación de 1000 g por 5 min. Las células de granulosa (CGM y CC) se concentraron y se incubaron por una hora en el medio de maduración ovocitaria a 38.5 °C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂. El medio de maduración empleado fue preparado con menos de 12 h de anticipación y se colocó en gotas de 40 µL en placas Petri de 35 x 15 mm cubiertos con aceite mineral con la finalidad de equilibrar la temperatura y pH de las gotas. Se seleccionaron las células de granulosa y se colocaron en las gotas de medio de maduración de los ovocitos con 8 - 10 CCO por gota. Independientemente para cada tipo de células de la granulosa se dividieron aleatoriamente a los ovocitos en dos grupos, teniendo así a los ovocitos que maduraron en co-cultivo con células de la granulosa (grupo de tratamiento CGM o tratamiento CC), y, por otro lado, a los ovocitos que maduraron sin co-cultivo con las células de la granulosa (grupo control). El co-cultivo se realizó a 38.5 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa durante 32 a 36 h. (Castro, 2018).

5.3.10. Evaluación de la maduración ovocitaria

Luego del periodo de maduración los CCO fueron lavados en Medio 199 con HEPES suplementado que fue incubado a 38.5 °C. Las CC que aún se mantenían adheridas a la superficie del ovocito fueron desprendidas con ayuda de hialuronidasa líquida y una denudación mecánica mediante pipeteos suaves. La maduración de los ovocitos se evidenció por la presencia del primer cuerpo polar observado al microscopio de luz invertido.

Luego de la denudación y recolección de los ovocitos maduros, se recuperaron las CC de los CCO que maduraron *in vitro* y se procedió a la etapa de lavado y finalmente al cultivo de estas CC por 6 días.

Para la etapa de desarrollo embrionario, los ovocitos que maduraron *in vitro* del grupo control y del grupo tratamiento CGM fueron los usados en la técnica de FIV y activación química.

5.3.11. Selección espermática

En una placa Petri se disectó la zona cauda de los epidídimos y se limpió con PBS hasta que no quedaran restos de tejido adiposo ni vasos sanguíneos. Una vez limpios, se hicieron pequeños trozos del epidídimo en 1 mL de medio HAM F-10 a 37 °C, este se dejó reposar por 10 min y a la vez se evaluó la presencia de movilidad espermática en dichas muestras. En seguida se recuperó el sobrenadante y se realizó la técnica *swim up*, lavándolas a 1600 rpm por 7 min. Después de la centrifugación se descartó el sobrenadante, se rescató el *pellet* y este fue depositado en el fondo de un tubo de 1.5 mL que contenía 200 µL de medio HAM con BSA (15 mg/mL), este tubo se dejó incubando a 38.5 °C con un ángulo de inclinación de 45° por 1 hora. Después de ese tiempo se recuperaron volúmenes de 100 - 150 µL del sobrenadante y se evaluó la concentración y movilidad espermática.

5.3.12. Fertilización *in vitro* (FIV)

Los ovocitos maduros se lavaron e incubaron en el medio de fertilización a 38.5 °C de CO₂ y 100% de humedad relativa hasta que llegara el momento de fertilización. La FIV se realizó en gotas de 40 µL de medio de fertilización con una concentración final de 1-2 x10⁶ de espermatozoides/mL. Se colocaron 8 ovocitos por cada gota, y finalmente se cubrió la placa de cultivo con aceite mineral. Los espermatozoides y ovocitos fueron incubados a 38.5 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad durante 18 h.

5.3.13. Activación química

Los ovocitos desnudos que no eran destinados para FIV fueron incubados en Medio 199 con HEPES suplementado con 5 µM de ionomicina por 5 min, seguido de lavados en medio KSOM, luego pasaron por una exposición en medio KSOM suplementado con 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) por 2 h en atmósfera húmeda, 5% CO₂ a 38.5

°C. Se realizaron lavados, considerando un máximo de 8 ovocitos en gotas de 40 µL de medio de cultivo de embriones (KSOM suplementado), cubierto con aceite mineral.

5.3.14. Cultivo de embriones

Para los ovocitos que pasaron por FIV, transcurridas las 18 h se separaron los espermatozoides adheridos a la superficie de los ovocitos mediante repetidos pipeteos y se lavaron con el medio KSOM a 38.5 °C. Luego, en placas de 35x10 mm que contenían gotas de 40 µL con medio cultivo de embriones (KSOM suplementado) se colocaron 8 ovocitos por gota y se cubrieron con aceite mineral. Los presuntos cigotos fueron cultivados a 38.5 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa durante 7 días.

En el caso de los ovocitos que se usaron para activación química, el cultivo de embriones se llevó a cabo inmediatamente después de la activación a 38.5 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa durante 7 días.

5.3.15. Evaluación del desarrollo embrionario

En el tercer, quinto y séptimo día del cultivo, se procedió a evaluar el desarrollo embrionario de manera visual. Los embriones fueron clasificados como: embrión de 2 células, 4 células, 8 células, mórula (más de 16 células) y blastocistos.

5.3.16. Análisis estadístico

Para la evaluación de los datos de vitalidad y concentración del cultivo de CGM y CC, se aplicó el test de Shapiro-Wilk para la determinación de la normalidad, y para la prueba estadística correspondiente se empleó la prueba T-Student y Wilcoxon (para pruebas paramétricas y no paramétricas, respectivamente). Es así que tanto para la vitalidad como para la concentración en el caso de las CGM se realizaron comparaciones entre el pre-Percoll, post-Percoll y a las 168 h del cultivo, y en el caso de las CC las comparaciones se realizaron a las 24 h y 120 h del cultivo *in vitro*.

Para realizar la evaluación respecto a la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario, se contrastó el grupo control con los tratamientos con la prueba de Chi-

Cuadrado. Adicionalmente, se realizó una comparación porcentual entre las técnicas de producción embrionaria (Activación química y FIV) con un nivel de significancia de 0.05.

VI. RESULTADOS

6.1. Morfología de las células de granulosa

Durante la evaluación de los parámetros principales, vitalidad y concentración, se evidenció la morfología circular con borde irregular y granular característico de las células de granulosa (Figura 10 y Figura 11).

6.2. Cultivo celular *in vitro* de las células de granulosa murales

El cultivo de las CGM fue corto, con una duración de 168 h. El cultivo mostró un crecimiento acelerado entre las 0 h (inicio del cultivo) y las 24 h de iniciado, con una ligera disminución en la concentración durante las siguientes horas de cultivo. Cabe resaltar que hubo solo proliferación de las CGM y estas mantuvieron su morfología durante el tiempo que duró el cultivo *in vitro*. A las 72 h del cultivo se pudo observar pequeñas aglomeraciones conocidas como colonias de células de granulosa, las cuales crecieron en número, y para las 168 h fueron más notorias (Figura 12).

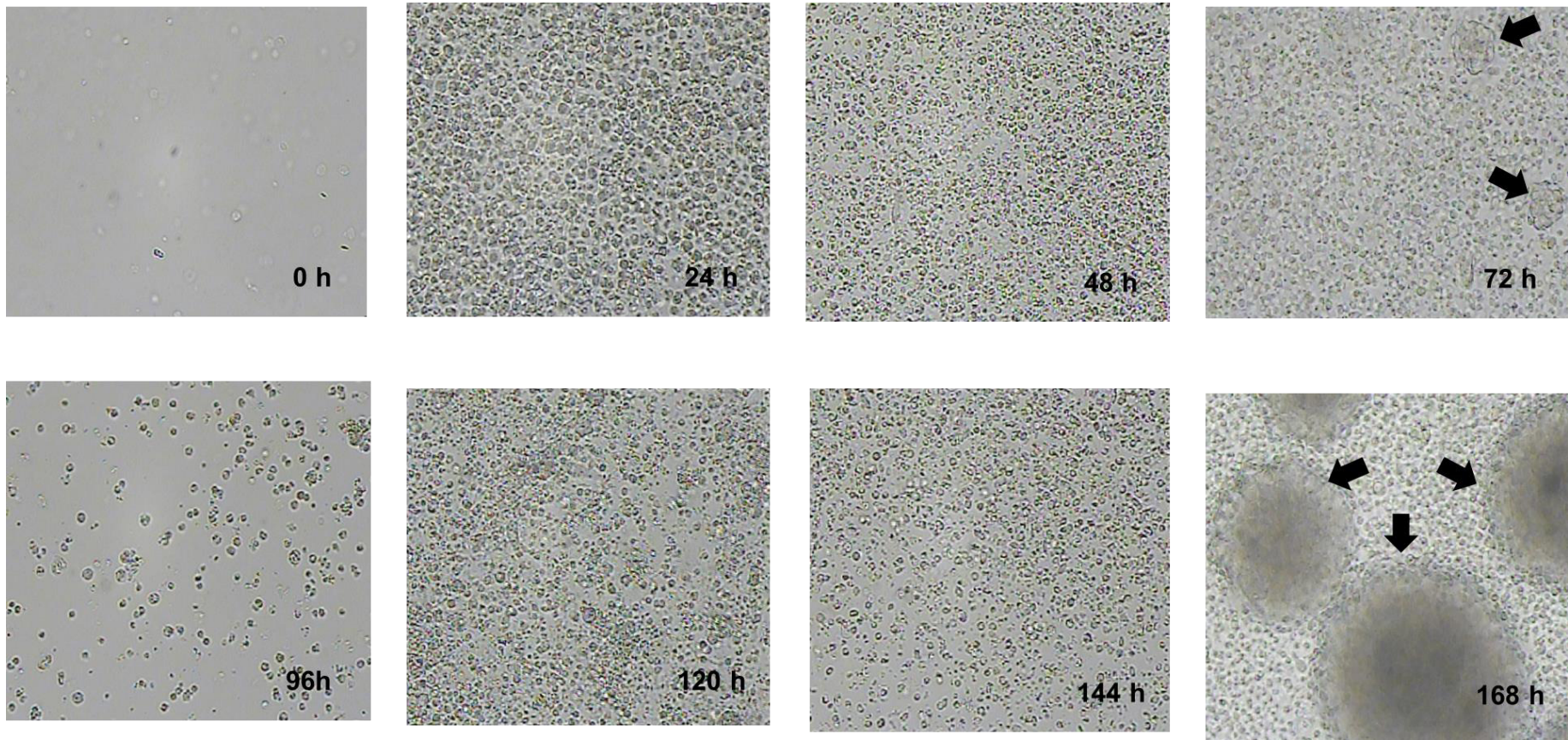


Figura 12. Cultivo celular *in vitro* de las CGM durante 168 h. Entre las 72 h y 168 h del cultivo se observó un gran aumento de las colonias de CGM. Las colonias de las CGM son señaladas por las flechas negras. Observación a 100x.

Durante el cultivo de las CGM se realizó el monitoreo de las células evaluando los parámetros de vitalidad y concentración, los datos individuales del monitoreo se muestran en el anexo, Tabla 8 y Tabla 9 respectivamente.

Respecto a la vitalidad (%) se observó una ligera disminución al comparar el antes y después del proceso de purificación de las CGM, posterior a ello se vio un aumento hasta las 168 h. Para poder evidenciar estadísticamente este cambio se realizó un análisis entre la vitalidad antes de la etapa de purificación (pre-Percoll), después de la etapa de purificación (post-Percoll – 0 h) y al finalizar el cultivo (168 h). Inicialmente se obtuvo la media y la desviación estándar (D.S.) de cada una de estas 3 etapas: pre-Percoll (56.76 ± 23.59), post-Percoll (47.94 ± 19.77) y 168 h (59.55 ± 25.71). La prueba Shapiro-Wilks mostró una distribución normal para las variables ($p > 0.05$), entonces el análisis paramétrico T-Student no mostró una diferencia estadística significativa entre estos: pre-Percoll y post-Percoll ($p = 0.866$), post-Percoll y 168 h ($p = 0.764$), y finalmente entre pre-Percoll y 168 h ($p = 0.476$) (Figura 13).

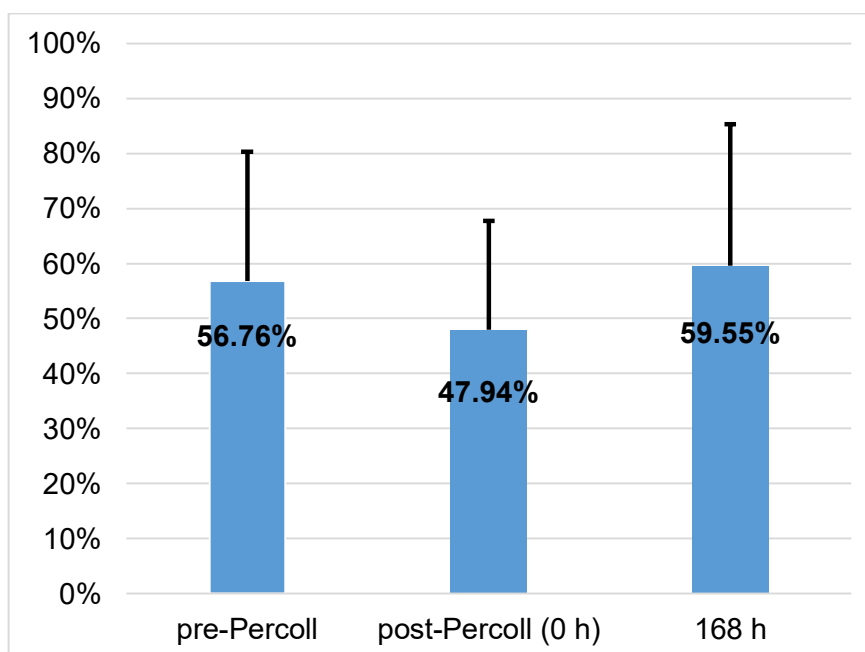


Figura 13. Porcentaje promedio de la vitalidad del cultivo de CGM durante su evaluación pre-Percoll, post-Percoll (0 h) y a las 168 h del cultivo. Las barras significan

D.S. N = 720 ovocitos.

En el caso de la concentración (Millón/mL) fue similar al de la vitalidad, se observó una disminución luego de la purificación de las CGM, y posterior a ello una disminución al llegar a las 168 h. Para poder evidenciar estadísticamente este cambio se realizó un análisis entre la concentración antes de la etapa de purificación (pre-Percoll), después de la etapa de purificación (post-Percoll) y al finalizar el cultivo (168 h). Inicialmente se obtuvo la media y la desviación estándar (D.S.) de cada una de estas 3 variables: pre-Percoll (19.07 ± 18.31), post-Percoll (7.32 ± 8.64) y 168 h (5.78 ± 10.65). Posteriormente, la prueba de normalidad Shapiro-Wilks indicó que no hubo una distribución normal para las variables ($p < 0.05$), entonces se llevó a cabo el análisis no paramétrico o prueba de Wilcoxon donde entre el pre-Percoll y post-Percoll si existió una diferencia significativa ($p < 0.001$) a favor del pre-Percoll al igual que en el caso del pre-Percoll y las 168 h ($p = 0.009$), caso contrario, entre el post-Percoll y las 168 h no se evidenció una diferencia significativa ($p = 0.249$) (Figura 14).

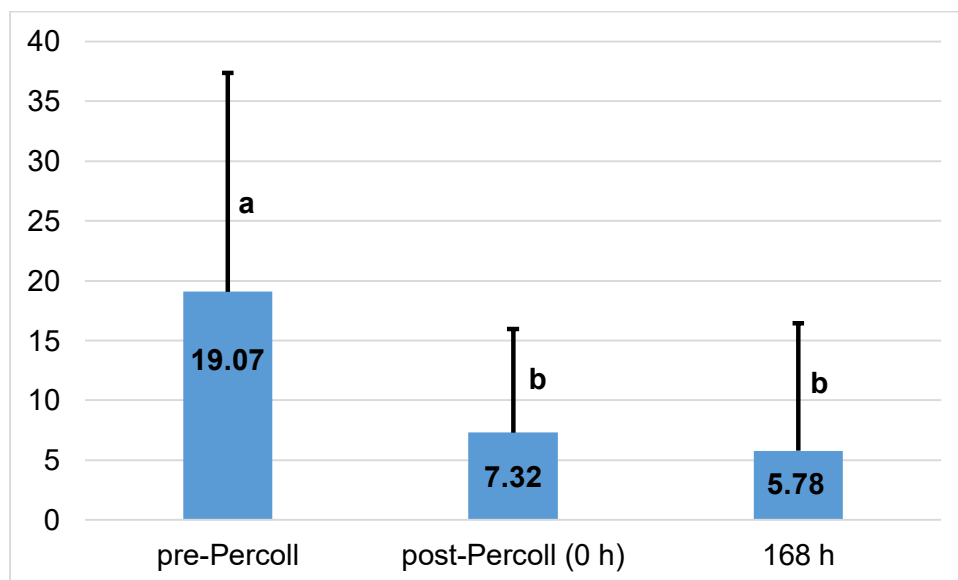


Figura 14. Concentración (millón/mL) del cultivo de CGM durante su evaluación pre-Percoll, post-Percoll (0 h) y a las 168 h del cultivo. Los exponentes diferentes (^{a, b}) indican que hay diferencia estadística significativa. Las barras significan D.S. N = 720 ovocitos.

6.3. Cultivo celular *in vitro* de las células de granulosa del cúmulus

El cultivo de las CC transportadas a 10 °C tuvo un crecimiento similar a las CGM, aunque con menor densidad. El cultivo fue corto con una duración de 144 h, mostró un crecimiento acelerado entre las 0 h y 24 h de iniciado el cultivo con una disminución en la concentración durante las siguientes horas. Cabe resaltar que hubo solamente proliferación de las CC, esto quiere decir que se mantuvo su morfología original durante el tiempo que duró el cultivo *in vitro* sin experimentar alguna diferenciación (Figura 15).

Por otro lado, el cultivo *in vitro* de las CC de la única muestra trasladada a 38 °C fue monitoreada por 264 h. A las 24 h se evidenció indicios de proliferación de las CC. A las 72 h se observó una gran diferencia resaltando la primera formación de una colonia, pero la estructura de dicha colonia era diferente debido a que las células con morfología redonda se encontraban al centro, y alrededor de estas las células que adquirieron una morfología del tipo fibroblástico. Para las 120 h se observó un mayor crecimiento de esta estructura de colonia. A las 168 h y 192 h las células que estaban adquiriendo una morfología tipo fibroblástico fueron evidenciando aún más esa forma. Finalmente, para las 264 h las células que formaban el centro de la colonia habían proliferado aún más y esa estructura fue más oscura y densa, además, hubo una mayor densidad de las células de tipo fibroblástico y estas mostraron notoriamente una adherencia a la monocapa de gelatina (Figura 16).

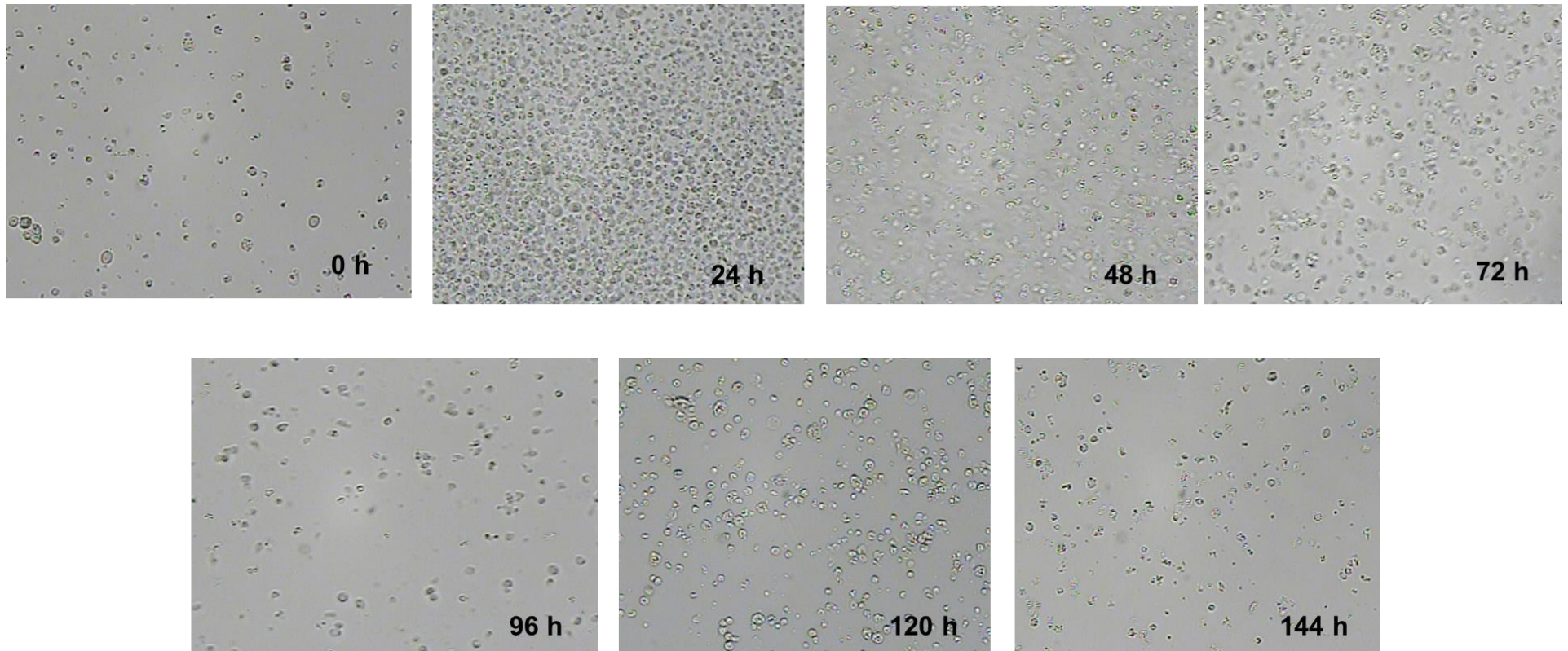


Figura 15. Cultivo celular *in vitro* de las CC durante 144 h. Entre las 0 h a 24 h se observó una gran proliferación. Observación a 100X.

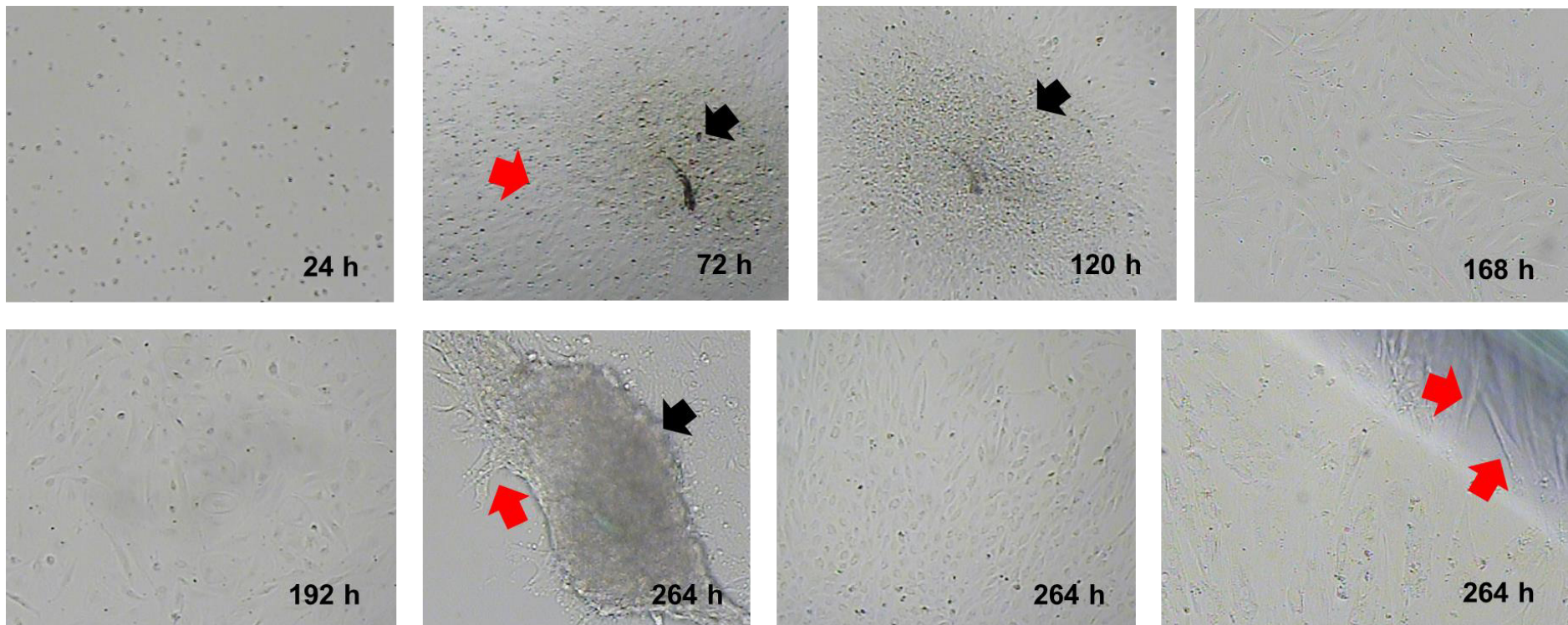


Figura 16. Cultivo celular *in vitro* de las CC durante 264 h. A las 72 h se observó la primera colonia formada con una estructura particular. A las 264 h las células de tipo fibroblástico mostraron una clara y notoria adherencia a la monocapa de gelatina. Las flechas de color negro señalan a las células redondas y las flechas de color rojo señalan a las células de tipo fibroblástico. Observación a 100 X.

Durante el cultivo de las CC transportadas a 10°C se realizó el monitoreo de las células evaluando los parámetros de vitalidad y concentración, los datos individuales del monitoreo se muestran en el anexo, Tabla 10 y Tabla 11 respectivamente.

Se observó un aumento en el porcentaje de la vitalidad al transcurrir las 24 h con respecto a las 120 h de cultivo de las CC. Para poder evidenciar estadísticamente este cambio inicialmente se obtuvo la media y la desviación estándar (D.S.) de estos 2 tiempos: 24 h ($22.50 \pm 3.54\%$) y 120 h ($82.23 \pm 13.27\%$) (Figura 17). Posteriormente, la prueba de normalidad Shapiro-Wilks para estos tiempos no tuvo distribución normal ($p < 0.05$), entonces se llevó a cabo la prueba de Wilcoxon donde entre este par no hubo diferencia significativa ($z = -1.342$, $p = 0.18$).

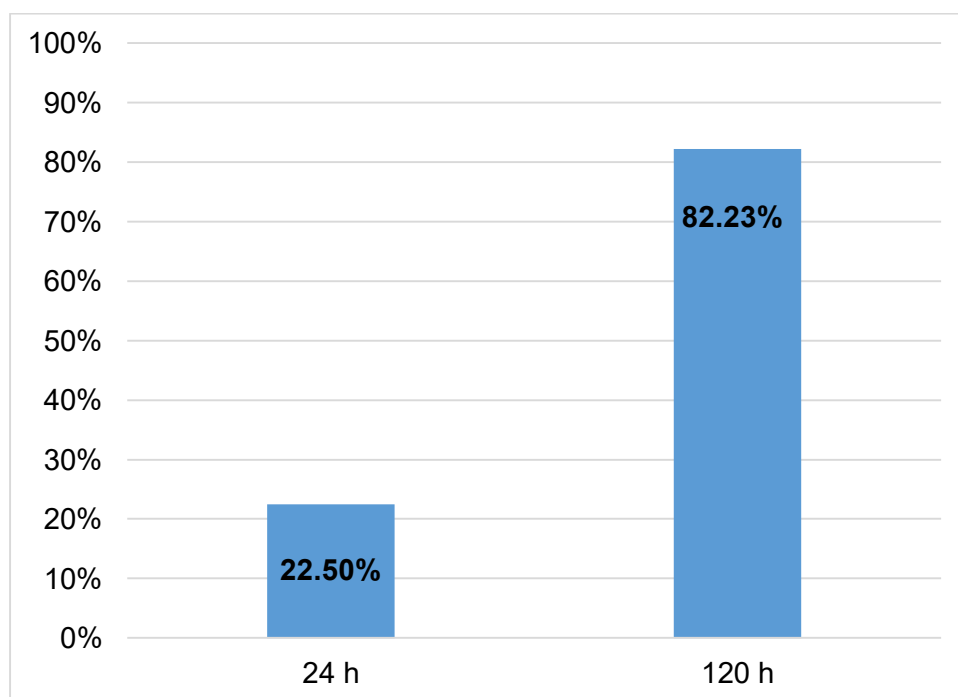


Figura 17. Media del porcentaje (%) de vitalidad del cultivo de CC a las 24 h y 120 h.

N = 59 ovocitos.

En el caso de la concentración (Millón/mL) fue de manera similar a la vitalidad, hubo un ligero aumento a partir de las 24 h de cultivo de las CC. Para poder evidenciar estadísticamente este cambio se realizó un análisis entre lo obtenido a las 24 h y a las 120 h. Con la media y la desviación estándar (D.S.) de estos dos tiempos o variables: 24 h (0.08 ± 0.04) y 120 h (0.23 ± 0.15) (Figura 18), se prosiguió con la prueba de normalidad Shapiro-Wilks el cual no mostro una distribución normal para las variables ($p < 0.05$). Es así, que se llevó a cabo la prueba Wilcoxon en el cual no hubo diferencia significativa entre estos tiempos ($z = -1.000$; $p = 0.317$).

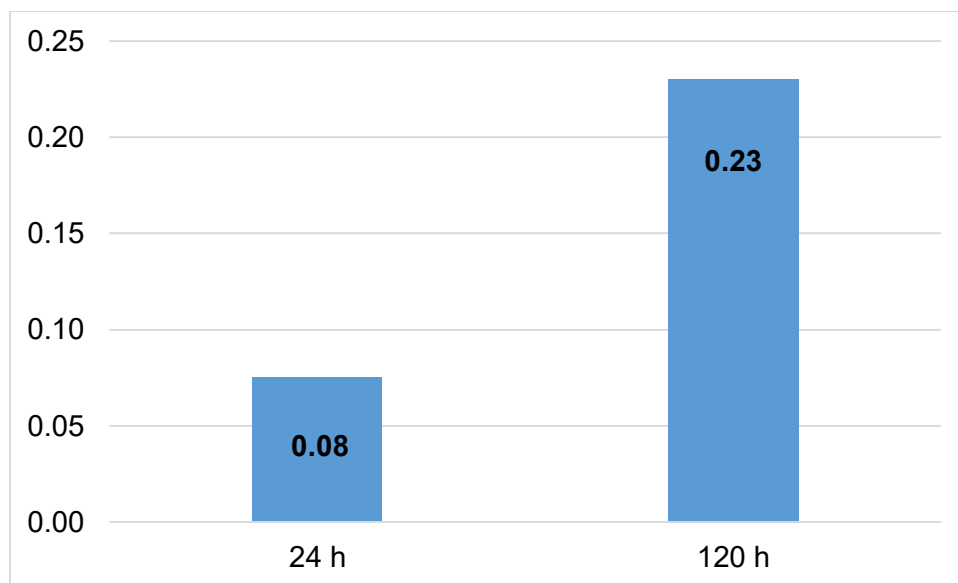


Figura 18. Media (Millón/mL) de la concentración del cultivo de CC a las 24 h y 120 h.

N = 59 ovocitos.

6.4. Efecto del co-cultivo de las células de granulosa murales - ovocitos

Durante la etapa de maduración de los CCO sin co-cultivo con las CGM (grupo control) y por otro lado de los CCO con co-cultivo con las CGM (grupo tratamiento), las CGM formaron colonias como se puede observar en la Figura 19.A y 19.B. En la Figura 19.A se observan las colonias de CGM aisladas de los CCO con nula interacción entre estas, sin embargo, en la Figura 19.B se visualiza una ligera interacción entre una colonia de CGM y el CCO, resaltando proyecciones citoplasmáticas entre las CGM y las CC del CCO.

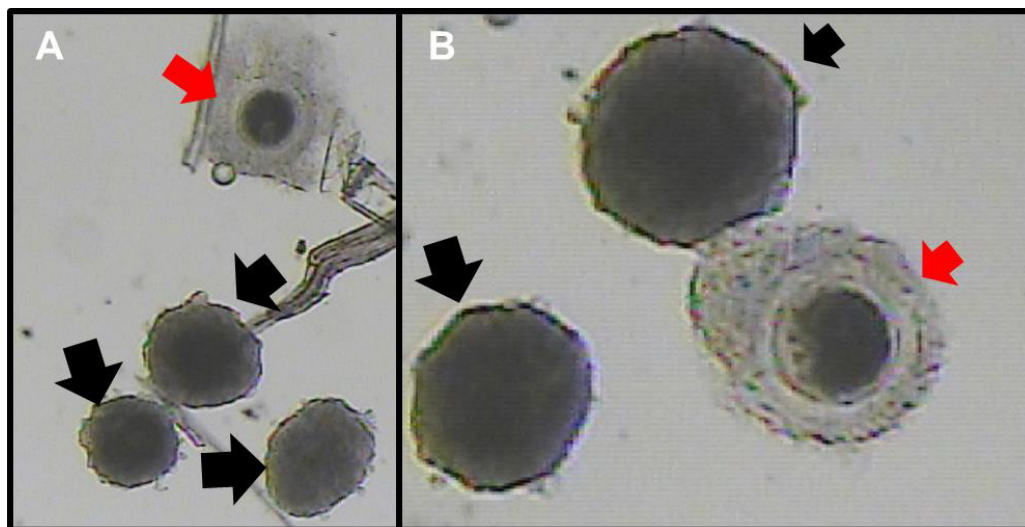


Figura 19. Interacción entre el CCO y las CGM durante la maduración ovocitaria *in vitro*. A. Colonias de CGM y el CCO sin interacción, B. Interacción entre una de las colonias de CGM con el CCO. Las flechas de color negro señalan a las colonias de CGM y las flechas de color rojo a los CCO. Observación a 80X.

Adicionalmente, se observaron los resultados de la maduración ovocitaria en ambos grupos: grupo control (Figura 20.A, 20.B) y tratamiento (Figura 20.C, 20.D).

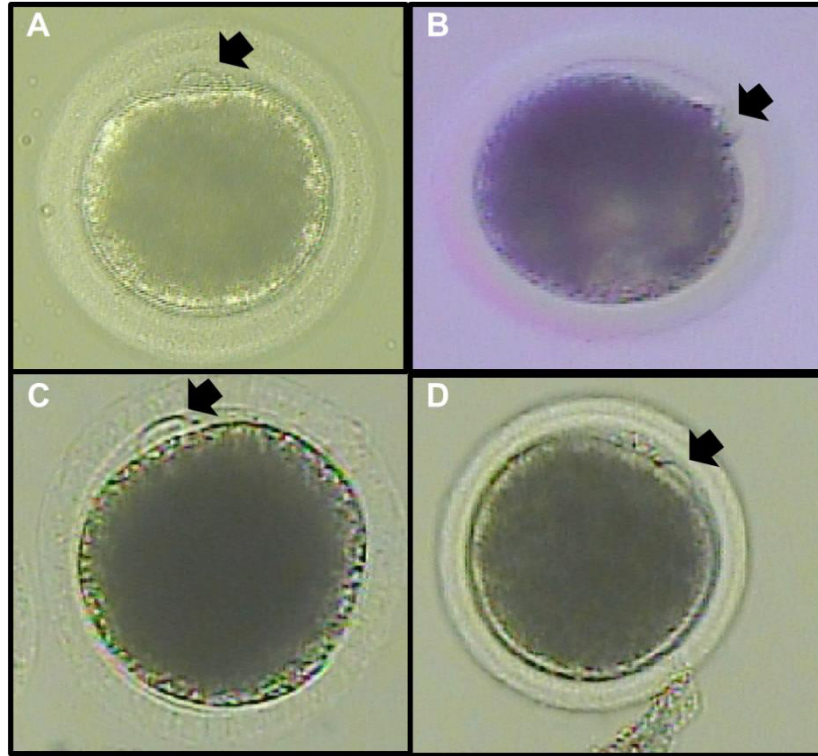


Figura 20. Ovocitos maduros del grupo control y tratamiento CGM, con presencia del cuerpo polar. A y B, ovocitos que pertenecen al control. C y D ovocitos que pertenecen al tratamiento CGM. Las flechas de color negro señalan al cuerpo polar.

Observación a 250X.

Se maduraron 493 ovocitos en co-cultivo, en un número que variaba de 333 a 74571 CGM por ovocito (Anexo - Tabla 12). En ambos grupos se observaron los cuerpos polares de los ovocitos maduros obteniéndose un porcentaje de maduración de 18.02% en el grupo control, mientras que en el grupo tratamiento se obtuvo 18.64% (Tabla 1, Figura 23). Sin embargo, se observó una mejor calidad de ovocitos en el grupo tratamiento debido a que los del grupo control mostraron un citoplasma dañado, contraído y heterogéneo.

Tabla 1. Número ovocitos y el porcentaje de maduración ovocitaria *in vitro*

Grupo	N° Ovocitos total	N° Ovocitos maduros	% Maduración
Control	333	60	18.02
Tratamiento CGM (Co-cultivo ovocito-CGM)	177	33	18.64
Tratamiento CC (Co-cultivo ovocito-CC)	16	3	18.75
Total	526		

Al analizar los resultados mediante Chi-Cuadrado para comparar estos 3 grupos no se encontraron diferencias significativas ($p = 0.984$).

6.5. Efecto del co-cultivo de las células de granulosa del cúmulus - ovocitos

Durante la etapa de maduración de los CCO sin co-cultivo con las CC (grupo control) y por otro lado de los CCO con co-cultivo con las CC (grupo tratamiento), las CC formaron colonias como se puede observar en la Figura 21.B. En la Figura 21.A, y 21.C se observan colonias de CC interactuando con las células del cúmulus del CCO.

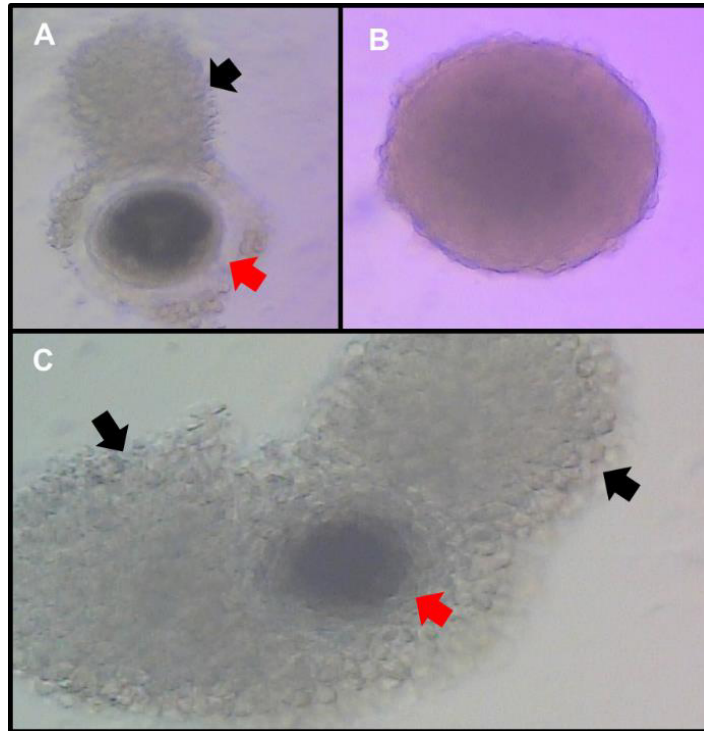


Figura 21. Interacción entre el CCO y las CC durante la maduración ovocitaria *in vitro*.

A. Interacción de una colonia de CC con el CCO, B. Una colonia o aglomeración celular, C. Varias colonias de CC alrededor de un CCO. Las flechas de color negro señalan a las colonias de CC y las flechas de color rojo a los CCO. Observación a 200X.

Se observó el resultado de la maduración ovocitaria en ambos grupos: grupo control (Figura 22.A, 22.B) y tratamiento (Figura 22.C, 22.D).

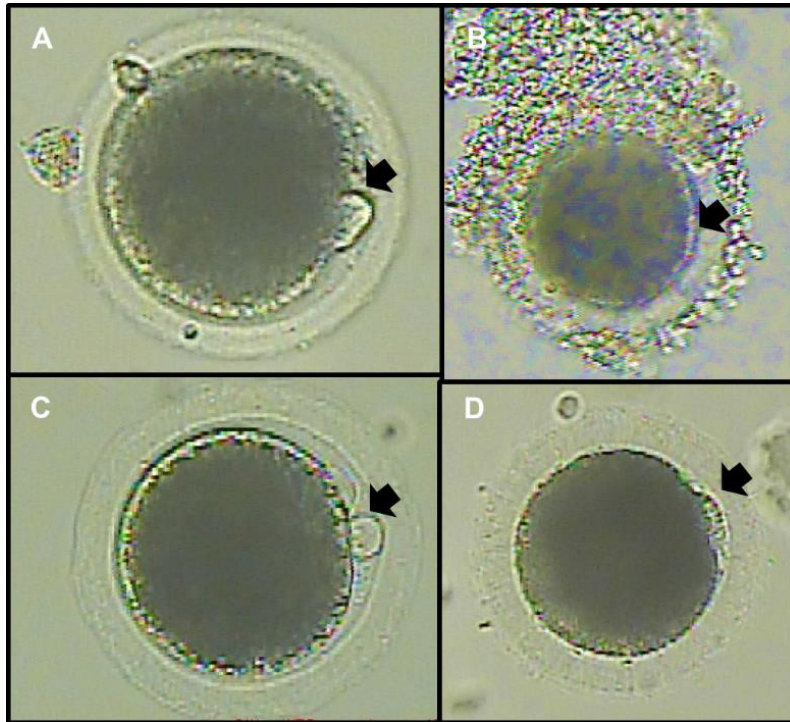


Figura 22. Ovocitos maduros del grupo control y tratamiento CC, con presencia del cuerpo polar. A y B, ovocitos del grupo control. C y D ovocitos del grupo tratamiento.

Las flechas negras señalan al posible cuerpo polar.

Observación a 250X.

Se maduraron 33 ovocitos en co-cultivo, en un número que variaba de 2 667 a 4 000 CC por ovocito (Anexo - Tabla 13). En ambos grupos se observaron los cuerpos polares de los ovocitos maduros, obteniéndose un porcentaje de maduración de 18.02% en el grupo control, mientras que en el grupo tratamiento fue de 18.75% (Tabla 1, Figura 23). Sin embargo, se observó una mejor calidad de ovocitos maduros en el grupo tratamiento debido a que tenían un citoplasma más homogéneo y no presentaron células de cúmulus alrededor, como lo que se observó en el grupo control (Figura 22.B).

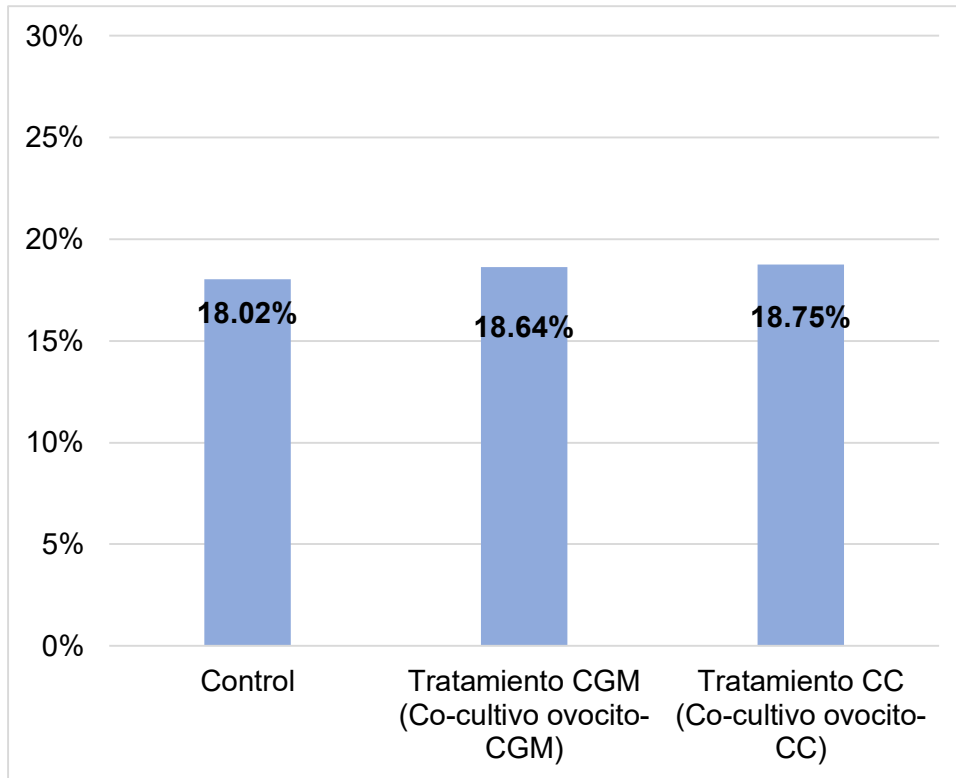


Figura 23. Porcentaje de la maduración ovocitaria *in vitro*. N = 526 ovocitos.

Al analizar los resultados mediante Chi-Cuadrado para comparar estos 3 grupos, no se encontraron diferencia significativa ($p = 0.984$).

Por otro lado, hubo una prueba adicional en el que algunos CCO se maduraron en un medio de cultivo a doble concentración de FSH lo que ocasionó una diferenciación inducida. Ello conllevó a un cambio de morfología de las CC que adquirieron una forma más alargada de tipo fibroblástico (Figura 24).



Figura 24. Complejo cúmulus-ovocito con sus CC diferenciadas. La flecha de color negro señala al ovocito y la flecha de color rojo señala a las CC. Observación a 200X.

6.6. Efecto derivado del co-cultivo con las células de granulosa sobre el desarrollo embrionario

Como resultado de la activación de los ovocitos del grupo control y del tratamiento con CGM (maduración en co-cultivo ovocito - CGM), se obtuvieron embriones en diferentes estadios que iban desde 2 células hasta blastocisto. En la figura 25 se visualizan los diferentes estadios alcanzados por los ovocitos del grupo control (Figuras 25.A, 25.B y 25.C) y el grupo tratamiento (Figuras 25.D, 25.E y 25.F).

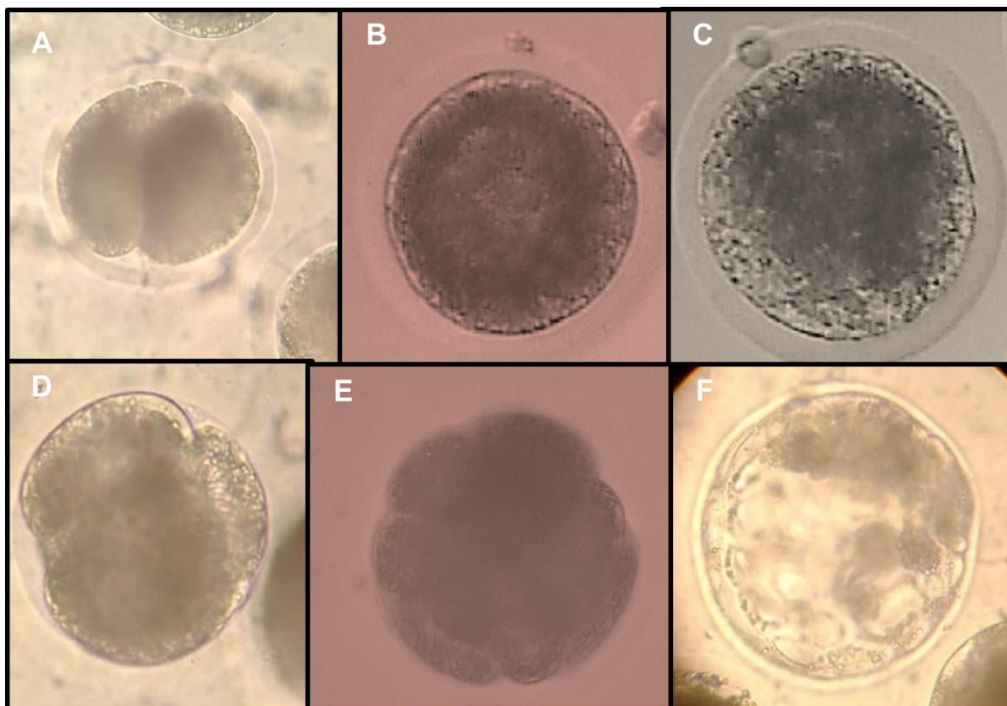


Figura 25. Embriones obtenidos por activación química. Grupo control (A, B y C). Grupo tratamiento CGM (D, E y F). A. Embrión en primera división, B. Blastocisto inicial, C. Blastocisto inicial; D. Embrión en segunda división, E. Mórula compacta, F. Blastocisto expandido. Observación a 250X.

Los resultados obtenidos de los embriones y las respectivas técnicas de desarrollo embrionario se muestran en la Tabla 14 (Anexo). El desarrollo embrionario obtenido por activación química de los ovocitos del grupo control fue de 17.68%, mientras que el del tratamiento CGM resultó en 35.71%. Al realizar el Chi-Cuadrado de estos dos grupos se mostró una diferencia significativa ($p = 0.004$) con respecto al porcentaje de desarrollo embrionario obtenido a favor del grupo de tratamiento CGM (Tabla 2).

Tabla 2. Número de embriones y porcentaje del desarrollo embrionario producido por activación química

Grupo	N° de ovocitos	N° de embriones por activación química	% desarrollo embrionario por activación química
Control	181	32	17.68 ^a
Tratamiento CGM (Co-cultivo ovocito-CGM)	56	20	35.71 ^b
Total	237		

Los exponentes diferentes (^{a, b}) indican que hay diferencia estadística significativa. N = 52 embriones.

En la Tabla 3 se muestra a los embriones desde 2 células hasta desarrollarse al estadio de blástula mediante la técnica de activación química. En la prueba de Chi-Cuadrado para contrastar cada uno de los estadios entre el grupo control y tratamiento CGM, el estadio de 2 células resultó ser estadísticamente significativa ($p = 0.004$), de manera similar para el estadio de 4 células ($p < 0.001$), 8 células ($p = 0.024$), y mórula ($p = 0.028$). En el caso de las blástulas, no se mostró diferencia estadística significativa entre ambos grupos ($p = 0.684$) (Tabla 3).

Tabla 3. Estadios embrionarios obtenidos por activación química

Grupo	N° de embriones por estadio obtenidos por activación química				
	2 Células	4 Células	8 Células	Mórula	Blástula
Control	32 ^a	23 ^a	18 ^a	14 ^a	5
Tratamiento CGM (Co-cultivo ovocito-CGM)	20 ^b	18 ^b	12 ^b	10 ^b	1

Los exponentes diferentes (^{a, b}) indican que hay diferencia estadística significativa entre el grupo control y tratamiento, independientemente para cada estadio. N = 52 embriones.

Por otro lado, el porcentaje de desarrollo embrionario que se obtuvo por FIV de los ovocitos del grupo control fue 6.06%, mientras que del tratamiento con CGM (co-cultivo ovocito - CGM) alcanzó los 9.26%, evidenciando una diferencia porcentual de más del 3%. Sin embargo, al realizar la prueba del Chi-Cuadrado respecto al porcentaje de desarrollo embrionario de estos dos grupos no se encontró diferencia significativa ($p = 0.595$) (Tabla 4).

Tabla 4. Número de embriones y porcentaje del desarrollo embrionario producido por FIV

Grupo	N° de ovocitos	N° de embriones por FIV	% Desarrollo embrionario por FIV
Control	33	2	6.06 ^c
Tratamiento CGM (Co-cultivo ovocito-CGM)	54	5	9.26 ^c
Total	87		

El mismo exponente (^c) indica que no hay diferencia estadística significativa entre el grupo control y tratamiento. N= 7 embriones.

En la Tabla 5 se muestra a los embriones desde 2 células hasta desarrollarse al estadio de blástula mediante la técnica FIV. La prueba de Chi-Cuadrado para contrastar cada uno de los estadios entre el grupo control y tratamiento CGM, resultó que para el estadio de 2 células no fue estadísticamente significativa ($p = 0.595$), de manera similar para el estadio de 4 células ($p = 0.722$) y 8 células ($p = 0.198$) (Tabla 5).

Tabla 5. Estadios embrionarios obtenidos por FIV

Grupo	N° de embriones por estadio desarrollados por FIV				
	2 Células	4 Células	8 Células	Mórula	Blástula
Control	2	1	1	0	0
Tratamiento CGM (Co-cultivo ovocito-CGM)	5	1	0	0	0

N = 7 embriones.

Finalmente, para contrastar los porcentajes embrionarios producidos por el tratamiento CGM que pasaron por activación química y FIV, se realizó un análisis Chi-Cuadrado entre ambas técnicas que resultó en una diferencia significativa ($p < 0.001$) y en el que fue mayor el porcentaje obtenido con la técnica de activación química (Tabla 6).

Tabla 6. Diferencia de porcentaje embrionario obtenido por activación química y FIV

Técnica de producción embrionaria	N° de ovocitos	N° de embriones	% Desarrollo embrionario
Tratamiento CGM-Activación química	56	20	35.71 ^b
Tratamiento CGM-FIV	54	5	9.26 ^c

Los exponentes diferentes (^b, ^c) indican que hay diferencia estadística significativa. N = 25 embriones.

En la Tabla 7 se muestra a los embriones desde 2 células hasta desarrollarse al estadio de blástula del tratamiento CGM que pasaron por activación química y FIV. La prueba de Chi-Cuadrado para contrastar cada uno de los estadios entre ambas técnicas de reproducción resultó para el estadio de 2 células estadísticamente significativa ($p < 0.001$), similar al del estadio de 4 células ($p < 0.001$), 8 células ($p < 0.001$), y mórula ($p = 0.001$), y, sobresaliendo porcentualmente los que pasaron por la técnica de activación química. En el caso de las blástulas, no hubo diferencia estadística significativa entre ambas técnicas ($p = 0.324$) (Tabla 7).

Tabla 7. Diferencia de número de embriones por estadio obtenidos por las técnicas de activación química y FIV

Método de producción embrionaria	N° de embriones por estadio				
	2 Células	4 Células	8 Células	Mórula	Blástula
Tratamiento CGM-Activación química	20 ^a	18 ^a	12 ^a	10 ^a	1
Tratamiento CGM-FIV	5 ^b	1 ^b	0 ^b	0 ^b	0

Los exponentes diferentes (^{a, b}) indican que hay diferencia estadística significativa entre el grupo control y tratamiento, independientemente para cada estadio. N = 25 embriones.

Para tener una mejor visualización de los resultados de las comparaciones realizadas para el análisis del desarrollo embrionario, estos se encuentran en la Figura 26. Para la técnica de activación química hubo diferencia significativa ($p=0.004$) entre el grupo control y tratamiento CGM, siendo mayor el porcentaje de desarrollo embrionario obtenido por el grupo tratamiento CGM. Por otro lado, para la técnica FIV no se observó diferencia significativa ($p=0.595$) entre el grupo control y tratamiento CGM. Finalmente, al comparar lo obtenido del grupo tratamiento CGM por las técnicas de activación química y FIV se observó una diferencia significativa ($p<0.001$), siendo mayor lo obtenido por la técnica de activación química.

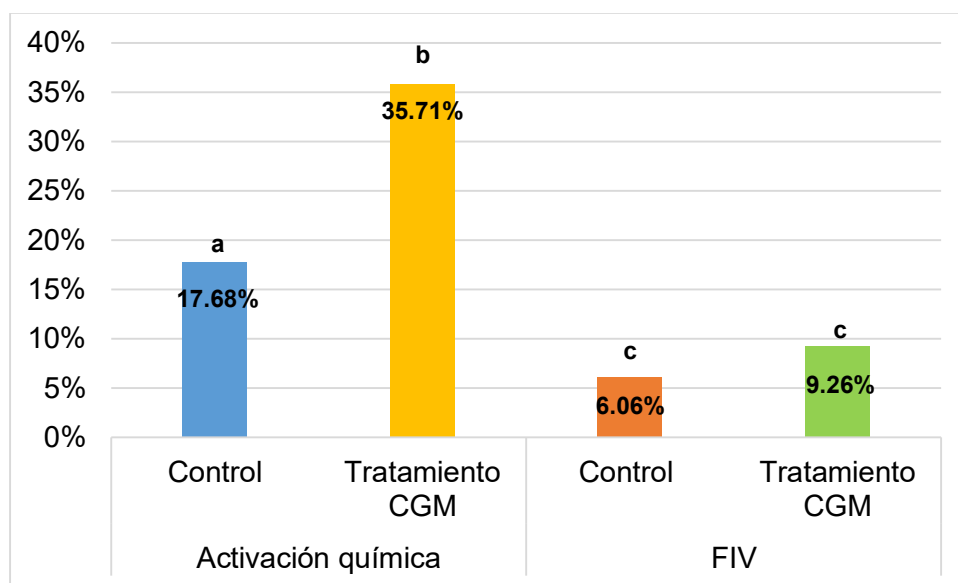


Figura 26. Desarrollo embrionario obtenido por cada técnica de producción embrionaria. Los exponentes diferentes (a, b, c) indican que hay diferencia estadística significativa entre los grupos. N = 59 embriones.

VII. DISCUSIÓN

7.1. Cultivo *in vitro* de las células de granulosa murales

El cultivo *in vitro* de las CGM se realizó alrededor de 168 h empleando como soporte una monocapa de gelatina, se usó este soporte porque las CG han demostrado adaptarse y proliferar bien en diversos sustratos, entre estos están los sustratos de colágeno tipo IV (Yenuganti y Vanselow, 2017) y laminina (Quinn et al., 2006) que permiten una buena proliferación y confluencia de estas células. En esta tesis se utilizó un soporte estructural derivado del colágeno que es la gelatina tipo B, el cual ha sido usado como soporte en el cultivo *in vitro* de células madre germinales de bovinos machos logrando mantenerlas y proliferarlas (Sahare et al., 2016), además, se ha empleado en ingeniería de tejidos llegando a mantener satisfactoriamente cultivos *in vitro* de esferoides tumorales de cáncer de mama por alrededor de 2 meses (Jiang et al., 2017).

Con estos antecedentes y como se esperaba, el uso del soporte de gelatina tipo B en los cultivos *in vitro* de CGM dieron buenos resultados evidenciándose en los parámetros analizado. La vitalidad aumentó desde las 0 h (47.94 ± 19.77) hasta las 168 h (59.55 ± 25.71) (Figura 13) y la concentración celular por su parte no varió significativamente desde las 0 h (7.32 ± 8.64) hasta las 168 h (5.78 ± 10.65) que duró el cultivo (Figura 14), y el progreso del cultivo de las CGM, así como la variación de estos parámetros se pueden observar en la Figura 12. El cambio más notorio fue al transcurrir las 24 h debido a que se observó un crecimiento rápido, lo cual también se evidenció en el cultivo *in vitro* de las CGM de humanos (Alcoba et al., 2012), siendo esto una característica propia de las CGM. Ello reforzaría la idea de que las condiciones como el soporte estructural y el medio de cultivo empleado fueron adecuadas para estas células. Sin embargo, a partir de las 48 h empezó a disminuir ligeramente la densidad celular, posiblemente debido a la escasez de los nutrientes que se agotaron por la rápida velocidad de la proliferación celular, además se debe considerar los efectos o sustancias liberadas por las células

necróticas que se encontraban en el cultivo (Regan et al., 2018). Todo ello se dio pese a la alimentación y cambio del medio de cultivo que se realizaba cada 2 días. Otra posible explicación es que debido al método de obtención de las CGM (por aspiración) el cultivo resultó heterogéneo lo cual influyó de manera negativa al crecimiento de las células de nuestro interés (Saadeldin et al., 2018). A partir de las 72 h de cultivo se pudieron observar formaciones iniciales de aglomeraciones de CGM llamadas colonias de CGM que resultan ser peculiares en estas células (Alcoba et al., 2012), estas colonias se forman con el fin de maximizar la adhesión intracelular y minimizar la energía intracelular (Sego et al., 2017; Zhou, 2016). Hasta las 168 h estas colonias de CGM crecieron en número, momento en el cual fueron más notorias y similares a las rosetas obtenidas en los cultivos *in vitro* de las CGM de camello (Saadeldin et al., 2018).

Durante el cultivo de las CGM los parámetros analizados como la vitalidad (Tabla 8) y concentración celular (Tabla 9) oscilaron entre las muestras trabajadas. Hubo una disminución porcentual de la vitalidad entre el pre-Percoll y el post-Percoll pasando de 56.76% a 47.94% respectivamente (Figura 13), esta disminución no fue estadísticamente significativa y se debería al proceso de purificación. Esto es reforzado por Aghadavod et al. (2015), debido a que realizaron el contraste de 3 métodos de aislamiento de CGM humanos, que son el método Ficoll, Percoll y Tampón de lisis de glóbulos rojos (RLB), lo que indica que la columna de Percoll es uno de los métodos de purificación menos agresivos que permite la supervivencia de las células hasta en un 80% y su posterior proliferación. Así mismo, la media de la vitalidad aumentó a 59.55% para las 168 h del cultivo (Figura 13), aunque tampoco resultó significativo con respecto al post-Percoll, sí existe una diferencia porcentual entre estos y se debería a que las células que fueron quedando son las que mejor se adaptaron a las condiciones *in vitro*. Por otro lado, la media de la concentración celular evidenció una disminución con respecto al pre-Percoll (19.07 Millones/mL) y post-Percoll (7.32 Millones/mL) (Figura 14), esta diferencia notoria resultó significativa debido al proceso de purificación. Este

proceso mediante la columna de Percoll permite separar principalmente a las CGM de glóbulos rojos, pues si estos se cultivan junto a las CGM podrían afectar negativamente sobre su vitalidad y proliferación (Aghadavod et al., 2015). Además, entre la media de la concentración del post-Percoll y las 168 h de cultivo se observó una disminución cayendo de 7.32 Millones/mL a 5.78 Millones/mL (Figura 14), sin embargo, esta caída no resultó significativa. Como se mencionó en los párrafos anteriores, hasta las 168 h se dio un incremento porcentual de la vitalidad y por su parte una disminución de la concentración celular, esta condición posiblemente se debió a que la densidad celular disminuyó por la necrosis o apoptosis de las CGM y se mantuvieron las restantes células vivas aprovechando los recursos formados por las células apoptóticas incluido sus núcleos a través de la fagocitosis (Regan et al., 2018).

7.2. Cultivo *in vitro* de las células de granulosa del cúmulus

El cultivo de las CC duró 144 h y se usó como monocapa el sustrato de gelatina tipo B al igual que en los cultivos de CGM. Los resultados fueron satisfactorios durante el cultivo *in vitro* evidenciándose en los parámetros como vitalidad que aumentó desde las 24 h ($22.50 \pm 3.54\%$) hasta las 120 h ($82.23 \pm 13.27\%$) (Figura 17), así como también se dio un aumento en la concentración celular (Millón/mL) desde las 0 h (0.08 ± 0.04) hasta las 120 h (0.23 ± 0.15) (Figura 18), y el progreso del cultivo de las CC, así como la variación de estos parámetros se pueden visualizar en la en la Figura 15. En el análisis de ambos parámetros, vitalidad y concentración celular de las CC, no hubo diferencia significativa debido a que se tuvieron pocas muestras procesadas, por ello, en los resultados se priorizó la estadística descriptiva.

Al hacer un contraste visual con respecto a la densidad celular entre las CGM (Figura 12) y las CC (Figura 15), en las primeras 24 h del cultivo se observó una mayor densidad en el cultivo de las CGM lo que se debería a 2 razones: primero, el método de obtención de las CGM permitió coleccionar un mayor número de estas a comparación de las CC, y

segundo, la velocidad de crecimiento de CGM resultó ser más rápida que las CC de manera similar a lo obtenido por Alcoba et al. (2012) al realizar cultivos *in vitro* de CGM y CC de humanos. A diferencia de las CGM, a partir de las 48 h las CC proliferaron aún más hasta el final del cultivo lo cual se podría deber a que las CC al ser colectadas post maduración del CCO permitió que el cultivo de CC sea más homogéneo y por ende estas células no competían con otras por los nutrientes, hormonas, entre otros factores del medio de cultivo (Saadeldin et al., 2018). Otra diferencia con las CGM es que las CC no proliferaron en el cultivo *in vitro* formando colonias, de forma semejante a los cultivos *in vitro* de CC de humanos (Alcoba et al., 2012), lo que conllevaría a la posible existencia de similitudes fisiológicas de las CG provenientes de humanos y alpacas.

Los resultados obtenidos mostraron que las condiciones *in vitro* para el cultivo de las CC de alpaca fueron las más idóneas, debido a que a las 120 h de cultivo se pudo apreciar tanto un alto porcentaje de vitalidad como de concentración celular siendo estos propios de un cultivo *in vitro* airoso.

7.3. Plasticidad de las células de granulosa (CGM y CC)

Se observó algo peculiar en el grupo de CC transportado a 38 °C (Figura 16) que difirió al de los transportados a 10 °C (Figura 15), esta diferencia radica en que en el cultivo *in vitro* de estos últimos solo hubo proliferación mientras que en el cultivo de la muestra de CC que se trasladó a 38 °C hubo tanto proliferación y diferenciación celular (Figura 16). Esta diferenciación es lo que normalmente se esperaría en los cultivos celulares *in vitro* en monocapa o de 2 dimensiones (2D) (Kossowska-Tomaszczuk et al., 2010), en este caso y como se observa en la Figura 16 un grupo de células dentro del cultivo proliferaron mientras que otras se diferenciaron adquiriendo una morfología tipo fibroblástico con capacidad de adherencia a la monocapa de gelatina, y dichas características fueron similares a lo reportado en especies cercanas a la alpaca como en cultivos 2D de CC de camellos (Saadeldin et al., 2018) y CGM de búfalo (Yadav et

al., 2018). Sin embargo, también se observó similitud de tal diferenciación con la especie humana, en los cultivos 2D de CGM (Kossowska-Tomaszczuk et al., 2010) y de CG luteinizantes (Kossowska-Tomaszczuk et al., 2009), ello sería un indicador de las similitudes fisiológicas que existen entre las CG de diferentes especies de mamíferos.

En trabajos como los de Pérez et al. (2017), Quinn et al. (2006), Saadeldin et al. (2018) y Yenuganti y Vanselow (2017), las temperaturas de traslado de las muestras biológicas hasta el laboratorio fueron temperaturas cálidas que oscilaron entre 20-35 °C. Esto sugiere que quizá las temperaturas bajas podrían afectar los cultivos de las células de granulosa de alpaca, y eso explicaría por qué las muestras trasladadas a 10°C no se diferenciaron. Por consiguiente, en un futuro para mayores pruebas se debería tener en cuenta esta variable con el fin de obtener resultados más robustos. Sin embargo, cabe resaltar que las CGM y CC trasladadas a 10°C mostraron un buen crecimiento *in vitro* en base a los parámetros analizados como vitalidad y concentración. De ahí que se sugiere una capacidad de sobrevivencia independiente del anclaje con una buena proliferación en suspensión, lo que evidenciaría una cualidad propia de células madre que sin esta no sobrevivirían en condiciones adversas (Barnes et al., 2018; Kossowska-Tomaszczuk et al., 2009; Varras et al., 2012).

Por otro lado, se observó en el grupo control casos de diferenciación inducida de CC del CCO durante la maduración ovocitaria *in vitro* (Figura 24), ello debido a una prueba adicional que involucró al FSH del medio de cultivo (Alam y Miyano, 2020) que actuó como un inductor de diferenciación al estar en una doble concentración de los niveles hormonales estandarizados para una maduración ovocitaria *in vitro* (Castro, 2018). Sin embargo, también se pueden dar casos de diferenciación espontánea de CC que podría variar de acuerdo a la edad por problemas de salud o cantidad de inductores de pluripotencia que pueden llegar a acumular estas células (Kossowska-Tomaszczuk et al., 2013; Saadeldin et al., 2018). Se podría inferir que esta capacidad de diferenciación se originó al inicio de la formación del folículo, además de que existirían transcritos

relacionados que se podrían haber adquirido por las diferentes vías de comunicación como las uniones gap o a partir de proteínas diferenciadoras provenientes del ovocito a través de las PTZ (Alam y Miyano, 2020; Saadeldin et al., 2018).

Los resultados del cultivo *in vitro* de esta tesis demostraron el gran potencial de diferenciación de las CC de alpaca. Sin embargo, *in vivo*, el potencial de estas células podría desencadenarse en diversas enfermedades ováricas que implicarían la metaplasia y transdiferenciación, como la metaplasia ovárica o el adipoma ovárico, lo cual además de enfermedades ocasionaría problemas reproductivos (Miliaras et al., 2007; citado por Saadeldin et al., 2018).

7.4. Efecto de las células de granulosa murales co-cultivadas con los ovocitos durante su maduración ovocitaria

Durante la evaluación post maduración del grupo control (ovocitos maduraron sin co-cultivo) y el grupo tratamiento CGM (co-cultivo de las CGM con los ovocitos durante su maduración *in vitro*) fue evidente la formación de colonias de las CGM (Sego et al., 2017). Estas colonias interactuaron con los CCO a través de proyecciones citoplasmáticas entre las CGM y las CC del CCO (Figura 19.B), dejando de lado a los ovocitos desnudos (sin capas de CC) (Figura 19). Este tipo de inclinación por los CCO se debería a que las CGM pueden interactuar principalmente con las CC del CCO mediante las uniones gap específicas como la Cx43 entre células de granulosa, y justamente esta interacción que se da *in vivo* en el folículo (García, 2016; Palma et al., 2012), mientras que los ovocitos desnudos al no tener capas de CC no podrían interactuar con las colonias de CGM en el co-cultivo.

El número de CGM que interactuaron con los ovocitos fue variable (Tabla 12), sin embargo, no se observó una correlación entre el número de CGM y el porcentaje de maduración ovocitaria *in vitro*. Cabe resaltar que, pese a haber usado como mínimo 333 CGM/ovocito se obtuvo un porcentaje alto de maduración con respecto a su control,

considerando que para llegar a la etapa de folículo antral pequeño en bovino se requiere de un número mínimo de 1500 células somáticas (CGM y CC) por ovocito (Braw-tal y Yossefi, 1997), siendo esto variable, dado que, en el caso de humanos se necesitan alrededor de 2 millones de células somáticas por ovocito (Arroyo et al., 2020). Por ende, independientemente de la presencia o ausencia de las CGM no se obtuvo una relación entre este y el porcentaje de maduración ovocitaria. Esto se comprobó al aplicar la prueba de Chi - Cuadrado, y no se obtuvo una diferencia significativa entre el control que alcanzó el 18.02% de maduración ovocitaria *in vitro* y el tratamiento CGM que logró un 18.64% (Tabla 1). Sin embargo, se debe resaltar que sí existe una ligera diferencia porcentual que fue mayor en el grupo del tratamiento CGM, y también con respecto a la calidad ya que los ovocitos del tratamiento CGM presentaron una mejor formación del cuerpo polar además de un citoplasma mucho más íntegro y homogéneo (Figura 20). Esta diferencia se debería a que durante el co-cultivo las CGM aportarían principalmente hormonas necesarias para la maduración ovocitaria *in vitro* como el estradiol, lo cual le brindaría al ovocito un mejor desarrollo y una mejor apariencia homogénea (Alcoba et al., 2012).

En general, los porcentajes de maduración ovocitaria obtenidos ya sea del grupo control o tratamiento CGM fueron alrededor del 18% y se encuentra dentro del rango obtenido en alpacas por Leisinger et al. (2014), que fue entre 5.7 - 39.4%. Sin embargo, fue relativamente menor a los 26.3 - 75.3% reportados por Huanca et al. (2014), y el 33.2% por Castro (2018). De esta manera, y con los resultados de este trabajo, para la alpaca se sugeriría que hay una variabilidad en el efecto del co-cultivo que es dependiente de la propia especie.

7.5. Efecto de las células de granulosa del cúmulus co-cultivadas con los ovocitos durante la maduración ovocitaria

En la evaluación post maduración del grupo control (ovocitos maduraron sin co-cultivo) y el grupo tratamiento CC (co-cultivo de las CC con los ovocitos durante su maduración *in vitro*), fue evidente la formación de colonias de las CC pese a que en el previo cultivo *in vitro* de estas CC no se observó tal característica, lo que se contrapone a lo obtenido por Alcoba et al. (2012) en cultivo de CC de humanos. Esta capacidad de las CC para formar colonias cuando están co-cultivo con las CCO se debería a que posiblemente aún las células tendrían la capacidad de poder realizar las funciones que hacían *in vivo*, por lo cual, frente al ovocito estas se agregarían y formarían colonias con el fin de unirse estrechamente y realizar sus respectivas funciones involucradas en la maduración ovocitaria (Palma et al., 2012). Las colonias de CC mostraron gran interacción con los ovocitos uniéndose tanto a los CCO como a los ovocitos desnudos (Figura 21). Esto se daría porque las CC pueden interactuar con facilidad con las CC de los CCO mediante las uniones gap específicas como la Cx43 entre células de granulosa, pero a su vez, con los ovocitos a través de proyecciones transzonales (Palma et al., 2012), lo cual ampliaría el panorama sobre la facilidad de las CC para poder interactuar de una manera más versátil en comparación a las CGM.

En referencia al número de CC que interactuaron con los ovocitos, se evaluaron 2 valores (Tabla 13). Se obtuvieron resultados positivos en lo que respecta a los porcentajes de maduración ovocitaria para el tratamiento CC de hasta 40%, aunque los valores empleados están de acorde a lo sugerido para llegar a la etapa de folículo antral pequeño que en el caso de bovinos sería un mínimo de 1500 células somáticas (CGM y CC) por ovocito (Braw-tal y Yossefi, 1997), los resultados porcentuales entre el control y el tratamiento CC no varió mucho. Ello se comprobó al aplicar la prueba de Chi - Cuadrado en el que no hubo diferencia estadística significativa en la maduración ovocitaria *in vitro* entre el control (18.02%) y el tratamiento CC (18.75%) (Tabla 1). Sin

embargo, se observó que el tratamiento CC logró un porcentaje mayor de maduración *in vitro* y que estos ovocitos eran de mejor calidad (Figura 22), lo que reforzaría la hipótesis de que el co-cultivo influiría en la maduración ovocitaria *in-vitro*. Esta diferencia se debería a que durante el co-cultivo las CC aportarían factores de crecimiento necesarios para la maduración ovocitaria *in vitro* como el GDF-9, que ayudaría al ovocito a tener un mejor desarrollo y calidad (Palma et al., 2012).

Pero, cabe resaltar que al igual que el control y los co-cultivos con CGM el porcentaje de maduración ovocitaria *in vitro* obtenido entre estos 3 grupos trabajados es relativamente bajo: control (18.02%), tratamiento CGM (18.64%), y tratamiento CC (18.75%). Si bien no se obtuvo una diferencia significativa entre los grupos, se observó un mayor porcentaje y calidad en los grupos de tratamiento, debido a que el co-cultivo brinda factores esenciales al ovocito que solo se obtienen *in vivo*. Este resultado fue similar a lo obtenido en bovinos y porcinos, en los que no se observa diferencia significativa entre el control y el co-cultivo, pero sí una diferencia porcentual y de calidad a favor de la maduración ovocitaria en co-cultivo de ovocitos con CCO y desnudos, y su posterior desarrollo embrionario (Konishi et al., 1996; Munakata et al., 2018). Sin embargo, esto varía entre especies, ya que en humanos sí se observa un aumento significativo entre el porcentaje de maduración del control (65.07%) y el del co-cultivo (84.28%) (Jahromi et al., 2015).

7.6. Efecto derivado del co-cultivo sobre el desarrollo embrionario

Los ovocitos del grupo control y del tratamiento CGM se usaron en las 2 técnicas de obtención de embriones (activación química y FIV), dando resultados alentadores. Es así que el desarrollo embrionario inducido por activación química mostró diferencia significativa entre el grupo control (17.68%) y tratamiento CGM (35.71%), y al contrastar cada estadio de ambos grupos resaltó lo obtenido por el tratamiento CGM, lo que se debería a que durante el co-cultivo entre el CCO y las CGM, estas CGM aportarían las

hormonas necesarias para que los ovocitos puedan madurar y tener mejores condiciones para su desarrollo en su posterior etapa como embrión (Tabla 3 y Figura 25). Por otro lado, por la técnica FIV no hubo diferencia significativa entre el grupo control (6.06%) y tratamiento CGM (9.26%), aunque sí existió una diferencia porcentual. (Tabla 4 y Tabla 5). Lo obtenido por FIV, tanto el control como tratamiento se encuentra por debajo del 14.2%– 29.2% reportado en alpacas por Castro (2018) y del 27.5% por Pérez et al. (2017), por lo que es probable que la variabilidad y diferencias en la calidad de las muestras expliquen la baja tasa de maduración para FIV. Sin embargo, con ambas técnicas se corroboró lo reportado por Konishi et al. (1996) y Munakata et al. (2018), siendo que pese a no haber diferencia significativa en la maduración entre control y tratamiento CGM sí hubo una influencia en el desarrollo embrionario como se observa en el FIV y principalmente en la activación química, resaltando de esa manera el efecto de co-cultivo de las CGM con los ovocitos durante su maduración *in vitro*.

Por último, el desarrollo embrionario mostró una diferencia significativa entre los ovocitos del tratamiento CGM que se indujo por activación química (35.71%) y por FIV (9.26%), al igual que entre sus estadios embrionarios con excepción del estadio de blástula (Tabla 6 y Tabla 7). Esta diferencia se daría por que la activación química solo involucra la capacidad del ovocito para desarrollarse en un embrión (Bos-Mikich et al., 2016), mientras que la técnica FIV involucra tanto la capacidad del ovocito como la del espermatozoide para que se dé un desarrollo embrionario, por lo que la calidad del gameto masculino también afectaría el resultado del FIV y el progreso embrionario. Con esto se debe mencionar que la alpaca macho también posee problemas reproductivos propios de la especie como una baja concentración de espermatozoides y un alto porcentaje de espermatozoides anormales (Evangelista, 2015), por lo que de acuerdo a los resultados obtenidos en el FIV el gameto masculino sería también un factor influyente.

VIII. CONCLUSIONES

- ✓ El cultivo *in vitro* de las CGM y CC de alpaca fue viable, ya que se obtuvo un aumento de la vitalidad y la concentración celular dentro del periodo de cultivo.
- ✓ El co-cultivo de los ovocitos con las CGM y CC de alpaca fue favorable para el porcentaje de maduración ovocitaria y la calidad de los ovocitos maduros.
- ✓ En el FIV el co-cultivo de los ovocitos con las CGM durante su maduración favoreció la calidad del desarrollo embrionario, mientras que en la activación química partenogénica el co-cultivo de los ovocitos con las CGM durante su maduración favoreció significativamente la calidad y el porcentaje de desarrollo embrionario.

IX. RECOMENDACIONES

- Comparar diferentes temperaturas de transporte de muestras, y su efecto en relación al cultivo de células de granulosa en alpaca.
- Evaluar la cinética de crecimiento de las CGM y las CC de alpaca.
- Iniciar cultivos de células de granulosa luteinizantes en alpaca.
- Probar diferentes sistemas de cultivo de células de granulosa de alpaca, incluyendo los cultivos 3D.

X. BIBLIOGRAFÍA

ABD EL-AZIZ, A., MAHROUS, U., KAMEL, S., and SABEK, A. Factors Influencing *in vitro* Production of Bovine Embryos: A Review. *Asian J Anim Vet Adv*, 2016, vol. 11, n° 1, p. 737-756.

AGHADAVID, Esmat, ZARGHAMI, Nosratollah, FARZADI, Laya, ZARE, Mina, BARZEGARI, Abolfazl, MOVASSAGHPOUR, Ali Akbar and NOURI, Mohammad. Isolation of granulosa cells from follicular fluid; applications in biomedical and molecular biology experiments. *Advanced biomedical research*, 2015, vol. 4, n° 1, p. 1-6.

ALAM, Md Hasanur and MIYANO, Takashi. Interaction between growing oocytes and granulosa cells *in vitro*. *Reproductive Medicine and Biology*, 2020, vol. 19, n° 1, p. 1-11.

ALCOBA, Diego Duarte, GÖDDE, Stefan, FERREIRA, Gustavo Dias, PIMENTEI, Anita Mylius, KUSSLER, Ana Paula, VALERIO, Edimárlei Gonsales, CORLETA, Helena von Eye, BRUM, Ilma Simoni. Morfologia de células murais da granulosa e do cumulus oophorus. *Revista HCPA*, 2012, vol. 32, n° 3, p. 382.

AL-RUBEAI, Mohamed (ed.). *Animal cell culture*. Cell Engineering. 1ra ed., vol. 9. Ireland: *Springer*, 2015. 766 p, ISBN. 978-3-319-10319-8.

ANDREI, Daniela, NAGY, Roland, VAN MONTFOORT, Aafke, TIETGE, Uwe, TERPSTRA, Martijn, KOK, Klaas, BERG, Anke, HOEK, Annemieke, KLUIVER, Joost, and DONKER Rogier. Differential miRNA Expression Profiles in Cumulus and Mural Granulosa Cells from Human Pre-Ovulatory Follicles. *MicroRNA*, 2019, vol. 8, n° 1, p. 61-67.

ARROYO, Armando, KIM, Beomsu and YEH, John. Luteinizing Hormone Action in Human Oocyte Maturation and Quality: Signaling Pathways, Regulation, and Clinical Impact. *Reproductive Sciences*, 2020, vol. 27, n° 6, p. 1223-1252.

BARNES, Tamara, RODRÍGUEZ, Juan, OLEA, Gabriela, MELANA COLAVITA, Juan, AGUIRRE, María. Cultivo de microesferoides 3D para estudios de pluripotencialidad tumoral en líneas renales humanas. *Libro de Artículos Científicos en Salud*, 2018, vol. 1, n° 1, p. 23-27.

BENKHALIFA, M., DEMIROL, A., SARI, T., BALASHOVA, E., TSOUROUPAKI, M., GIAKOUMAKIS, Y., and GURGAN, T. Autologous embryo-cumulus cells co-culture and blastocyst transfer in repeated implantation failures: a collaborative prospective randomized study. *Zygote*, 2012, vol. 20, n° 2, p. 173-180.

BIGGERS, John D. and RACOWSKY, Catherine. A brief outline of the history of human in-vitro fertilization. En: KOVACS, Gabor, BRINSDEN, Victoria, DECHERNEY and Alan (edit.). *In-Vitro Fertilization*. United Kingdom: *Cambridge University Press*, 2018, p. 1-7, ISBN. 9781108551946.

BOS-MIKICH, Adriana, BRESSAN, Fabiana, RUGGERI, Rafael, WATANABE, Yeda and MEIRELLES, Flávio. Parthenogenesis and human assisted reproduction. *Stem cells international*, 2016, vol. 1, n° 1, p. 1-8.

BRAW-TAL, R. and YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Reproduction*, 1997, vol. 109, n° 1, p. 165-171.

BRUŽAUSKAITĖ, Ieva, BIRONAITĖ, Daiva, BAGDONAS, Edvardas and BERNOTIENĖ, Eiva. Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes—different cell effects. *Cytotechnology*, 2016, vol. 68, n° 3, p. 355-369.

BUCCIONE, Roberto, SCHROEDER, Allen and EPPIG, John. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of reproduction*, 1990, vol. 43, n° 4, p. 543-547.

CASTRO MODESTO, Tania Milagros. “Efecto del fluido folicular de alpaca en la maduración ovocitaria in vitro de alpaca (*Vicugna pacos*)”. Asesora: Martha Valdivia Cuya. Tesis de Título Profesional. UNMSM. EAP Genética y Biotecnología, Lima, 2018.

COMBELLES, Catherine and HENNET, Margo. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *International Journal of Developmental Biology*, 2013, vol. 56, n° 10-11-12, p. 819-831.

COLOMBO, Martina, MORSELLI, Maria, APPARICIO, Maricy and LUVONI, Gaia. Granulosa cells in three-dimensional culture: A follicle-like structure for domestic cat vitrified oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 2020, vol. 1, n° 1, p. 1-7.

CUILING, Lu, WEI, Yang, ZHAOYUAN, Hu and YIXUN, Liu. Granulosa cell proliferation differentiation and its role in follicular development. *Chinese Science Bulletin*, 2005, vol. 50, n° 23, p. 2665-2671.

DE FIGUEIREDO, José, DE LIMA, Laritza, SILVA, José and SANTOS, Regiane. Control of growth and development of preantral follicle: insights from in vitro culture. *Animal Reproduction (AR)*, 2018, vol. 15, n° 1, p. 648-659.

DEL COLLADO, Maite, ANDRADE, Gabriella, MEIRELLES, Flávio, DA SILVEIRA, Juliano and PERECIN, Felipe. Contributions from the ovarian follicular environment to oocyte function. *Animal Reproduction (AR)*, 2018, vol. 15, n° 3, p. 261-270.

ESKEW, Ashley and JUNGHEIM, Emily. A History of Developments to Improve in vitro Fertilization. *Missouri medicine*, 2017, vol. 114, n° 3, p. 156.

EPPIG, John. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 2001, vol. 122, n° 6, p. 829-838.

EPPIG, John. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays*, 1991, vol. 13, n° 11, p. 569-574.

EVAGELISTA VARGAS, Oscar Diego. "Caracterización morfológica de los espermatozoides en alpacas macho (*Vicugna pacos*) de fertilidad comprobada". Asesores: Martha Valdivia Cuya y Alexei Santiani Acosta. Tesis de Título Profesional. UNMSM. EAP Biología, Lima, 2015.

FAO. SITUACIÓN ACTUAL DE LOS CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS EN PERÚ. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina. TCP/RLA/2914. 2005.

GARCÍA BALDERAS, Alejandra. "Mecanismos moleculares y regulación endocrina de la ovulación". 2016. Tutora: María José Peral Rubio. Tesis de Fin de Grado. Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia, España, 2016.

GILBERT, Scott and SINGER, Susan. *Developmental Biology*. 8th Ed. Sinauer Associates Inc, 2012. 788 p. ISBN. 087893250X, 9780878932504.

HAN, Bao-Sheng and GAO, Jun-Ling. Effects of chemical combinations on the parthenogenetic activation of mouse oocytes. *Experimental and therapeutic medicine*, 2013, vol. 5, n° 5, p. 1281-1288.

HUANCA, Wilfredo, CONDORI, Rosario, CHILENO, María, GARCÍA, Pedro, CAINZO, Juan, BECERRA, Juan. Evaluación de Cuatro Tiempos de Cultivo sobre la Tasa de Maduración y División Posfecundación *in vitro* de Ovocitos de Alpaca. *Revista de Investigaciones veterinarias del Perú*, 2014, vol. 25, n° 4, p. 468-476.

HUTT, Karla and ALBERTINI, David. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reproductive biomedicine online*, 2007, vol. 14, n° 6, p. 758-764.

INVITROGEN, Gibco. Cell culture basics. Life technologies, 2014.

JAHROMI, Bahia, MOSALLANEZHAD, Zahra, MATLOOB, Najmeh, DAVARI, Maryam and GHOBADIFAR, Mohamed. The potential role of granulosa cells in the maturation rate of immature human oocytes and embryo development: A co-culture study. *Clinical and experimental reproductive medicine*, 2015, vol. 42, n° 3, p. 111-117.

JIANG, Tao, MUNGUIA-LOPEZ, Jose, FLORES-TORRES, Salvador, GRANT, Joel, VIJAYAKUMAR, Sanahan, DE LEON-RODRIGUEZ, Antonio and KINSELLA, Joseph. Directing the self-assembly of tumour spheroids by bioprinting cellular heterogeneous models within alginate/gelatin hydrogels. *Scientific reports*, 2017, vol. 7, n° 1, p. 1-9.

KARSDAL, Morten (edit.). Type IV Collagen. Biochemistry of collagens, laminins and elastin: structure, function and biomarkers. United Kingdom: *Academic Press*, 2019.p. 37-49, ISBN. 978-0-12-817068-7.

KASPER, Cornelia, CHARWAT, Verena and LAVRENTIEVA, Antonina (edit.). Cell Culture Technology. *Springer*, 2018.174 p. ISBN. 978-3-319-74853-5.

KONISHI, M., AOYAGI, Y., TAKEDOMI, T., ITAKURA, H., ITOH, T. and YAZAWA, S. Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved in vitro development of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. *Theriogenology*, 1996, vol. 45, n° 3, p. 573-581.

KOSSOWSKA-TOMASZCZUK, Katarzyna and DE GEYTER, Christian. Cells with stem cell characteristics in somatic compartments of the ovary. *BioMed Research International*, 2013, vol. 1, n°1, p. 1-8.

KOSSOWSKA-TOMASZCZUK, K., PELCZAR, P., GÜVEN, S., KOWALSKI, J., VOLPI, E., DE GEYTER, C. and SCHERBERICH, A. A novel three-dimensional culture system allows prolonged culture of functional human granulosa cells and mimics the ovarian environment. *Tissue Engineering Part A*, 2010, vol. 16, n° 6, p. 2063-2073.

KOSSOWSKA-TOMASZCZUK, Katarzyna, DE GEYTER, Christian, DE GEYTER, Maria, MARTIN, Ivan, HOLZGREVE, Wolfgang, SCHERBERICH, Arnaud and ZHANG, Hong. The multipotency of luteinizing granulosa cells collected from mature ovarian follicles. *Stem cells*, 2009, vol. 27, n° 1, p. 210-219.

KULUS, Magdalena, KRANC, Wiesława, SUJKA-KORDOWSKA, Patrycja, CELICHOWSKI, Piotr, KONWERSKA, Aneta, JANKOWSKI, Maurycy, JESETA, Michał, SKOWROŃSKI, Mariusz, PIOTROWSKA-KEMPISTY, Hanna, BUKOWSKA, Dorota, ZABEL, Maciej, BRUSKA, Małgorzata, MOZDZIAK, Paul, KEMPISTY, Bartosz and ANTOSIK, Paweł. Transcriptomic analysis of expression of genes regulating cell cycle

progression in porcine ovarian granulosa cells during short-term in vitro primary culture. *Histochemistry and Cell Biology*, 2020, vol. 153, n°6, p. 397-412.

LEISINGER, C., COFFMAN, E., DA SILVA, M., FORSHEY, B., and PINTO, C. Factors affecting in vitro maturation of alpaca (*Lama pacos*) oocytes. *Animal reproduction science*, 2014, vol. 150, n° 1-2, p. 70-75.

LIU, Wei, XIN, Qiliang, WANG, Xiao, WANG, Sheng, WANG, Huarong, ZHANG, Wenqiang, YANG, Ye, ZHANG, Yanhao, ZHANG, Zhiyuan, WANG, Chao, XU, Yang, DUAN, Enkui, and XIANG, Guoliang. Estrogen receptors in granulosa cells govern meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes in mammals. *Cell death & disease*, 2017, vol. 8, n° 3, p. e2662-e2662.

LUYCKX, Valérie, DOLMANS, Marie-Madeleine, VANACKER, Julie, LEGAT, Camille, MOYA, Cristina, DONNEZ, Jacques and AMORIM, Christiani. A new step toward the artificial ovary: survival and proliferation of isolated murine follicles after autologous transplantation in a fibrin scaffold. *Fertility and sterility*, 2014, vol. 101, n° 4, p. 1149-1156.

MAGDANZ, Veronika, BORYSHPOLETS, Sergii, RIDZEWSKI, Clara, ECKEL, Barbara and REINHARDT, Klaus. The motility-based swim-up technique separates bull sperm based on differences in metabolic rates and tail length. *PloS one*, 2019, vol. 14, n° 10, p. e0223576.

MAMANI HERRERA, Patricia Mirelly. "Producción de embriones pre implantacionales in vitro mediante ICSI Y FIV en *Vicugna pacos*". Asesora: Martha Valdivia Cuya. Tesis de Título Profesional. UNMSM. EAP Genética y Biotecnología, Lima, 2019.

MINAGRI. Diagnóstico de Crianzas Priorizadas para el Plan Ganadero 2017 – 2021. DIRECCIÓN GENERAL DE POLÍTICAS AGRARIAS. Dirección de Estudios Económicos e Información Agraria. 2017.

MUNAKATA, Yasuhisa, UEDA, Manami, KAWAHARA-MIKI, Ryoka, KANSAKU, Kazuki, ITAMI, Nobuhiko, SHIRASUNA, Koumei, KUWAYAMA, Takehito and IWATA, Hisataka. Follicular factors determining granulosa cell number and developmental competence of porcine oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2018, vol. 35, n° 10, p. 1809-1819.

OKI, Yoshinao, ONO, Hiromasa, MOTOHASHI, Takeharu, SUGIURA, Nobuki, NOBUSUE, Hiroyuki and KANO, Koichiro. Dedifferentiated follicular granulosa cells derived from pig ovary can transdifferentiate into osteoblasts. *Biochemical Journal*, 2012, vol. 447, n° 2, p. 239-248.

PALMA, Gustavo, ARGAÑARAZ, Martin, BARRERA, Antonio, RODLER, Daniela, MUTTO, Adrian and SINOWATZ, Fred. Biology and biotechnology of follicle development. *The Scientific World Journal*, 2012, vol. 1. N° 1, p. 1-14.

PÉREZ, Manuel, ZEVALLOS, Juan, PEREZ, Uri. Comparación de sistemas de cultivo de embriones de alpacas. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 2017, vol. 19, n° 2, p. 157-164.

PHILIPPEOS, Christina, MITRY, Ragai and HUGHES, Robin (edit.). *Introduction to cell culture*. Human Cell Culture Protocols. *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, 2012, vol. 806, n°1, p. 1-13.

PUGA, Lis, LUQUE, Guillermina, BALESTRIN, Paula, MARÍN-BRIGGILER, Clara, ROMAROWSKI, Ana and BUFFONE, Mariano. Molecular basis of human sperm capacitation. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2018, vol. 6, p. 72- 125.

QUINN, M., MCGREGOR, S., STANTON, J., HESSIAN, P., GILLETT, W. and GREEN, D. Purification of granulosa cells from human ovarian follicular fluid using granulosa cell aggregates. *Reproduction, Fertility and Development*, 2006, vol. 18, n° 5, p. 501-508.

QUISPE EULOGIO, Carlos Enrique. "Niveles de fósforo en la dieta y sus efectos sobre el crecimiento y performance reproductivo en alpacas hembras pos destete". Asesores:

Carlos Gómez Bravo, Mariano Echevarría Rojas. Tesis para optar el Grado de Doctor. Universidad Nacional Agraria La Molina. Escuela De Posgrado De Doctorado En Ciencia Animal, Lima, 2019.

REGAN, Sheena, KNIGHT, Phil, YOVICH, John, LEUNG, Yee, ARFUSO, Frank and DHARMARAJAN, Arun. Granulosa cell apoptosis in the ovarian follicle—a changing view. *Frontiers in endocrinology*, 2018, vol. 9, n° 1, p. 61.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, C., TORRES-GARCIA, S., OLVERA-SANDOVAL, C., RAMIREZ-CASTILLO, F., MURO, A., AVELAR-GONZALEZ, F. and GUERRERO-BARRERA, A. Cell culture: history, development and prospects. *Int J Curr Res Aca Rev*, 2014, vol. 2, n° 12, p. 188-200.

RUIZ, J. Avances en biotecnología reproductiva aplicada en la hembra de los camélidos sudamericanos. Actualidades sobre adaptación, producción, reproducción y mejora genética en camélidos. *Universidad Nacional de Huancavelica, Perú*, 2008, vol. 1, n°1, p. 49-82.

RUIZ, Jaime, SANTAYANA, Paulo, MENDOZA, José, LANDEO, Leandra, HUAMÁN, Elizabeth, TICLLACURIA, Flamel, MUJICA, Fidel, SILVA, Mauricio, RATTO, Marcelo. Effect of oocyte maturation time, sperm selection method and oxygen tension on in vitro embryo development in alpacas. *Theriogenology*, 2017, vol. 95, p. 127-132.

SAADELDIN, Islam, SWELUM, Ayman, ELSAFADI, Mona, MAHMOOD, Amer, ALFAYEZ, Musaad and ALOWAIMER, Abdullah. Cumulus cells of camel (*Camelus dromedarius*) antral follicles are multipotent stem cells. *Theriogenology*, 2018, vol. 118, p. 233-242.

SAHARE, Mahesh, KIM, Sung-Min, OTOMO, Ayagi, KOMATSU, Kana, MINAMI, Naojiro, YAMADA, Masayasu and IMAIH, Hiroshi. Factors supporting long-term culture of bovine male germ cells. *Reproduction, Fertility and Development*, 2016, vol. 28, no 12, p. 2039-2050.

SALHAB, Mohamad, DHORNE-POLLET, Sophie, AUCLAIR, Sylvain, GUYADER-JOLY, Catherine, BRISARD, Daphné, DALBIES-TRAN, Rozenn, DUPONT, Joelle, PONSART, Claire, MERMILLOD, Pascal and UZBEKOVA, Svetlana. In vitro maturation of oocytes alters gene expression and signaling pathways in bovine cumulus cells. *Molecular reproduction and development*, 2013, vol. 80, n° 2, p. 166-182.

SALUSTRI, A., FULOP, C., CAMAIONI, A. and HASCALL, V. Oocyte-granulosa cell interactions. 2004, vol.1, n°1, p. 131-143.

SEGO, T., KASACHEUSKI, U., HAUERSPERGER, D., TOVAR, A. and MOLDOVAN, N. et al. A heuristic computational model of basic cellular processes and oxygenation during spheroid-dependent biofabrication. *Biofabrication*, 2017, vol. 9, n° 2, p. 024104.

SHEN, Qiuzi, CHEN, Mei, ZHAO, Xue, LIU, Yu, REN, Xinling and ZHANG, Ling. Versican expression level in cumulus cells is associated with human oocyte developmental competence. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 2020, vol. 66, n° 3, p. 176-184.

STOJKOVIC, Miodrag, MACHADO, Sergio, STOJKOVIC, Petra, ZAKHARTCHENKO, Valeri, HUTZLER, Peter, GONÇALVES, Paolo and WOLF, Eckhard. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biology of reproduction*, 2001, vol. 64, n° 3, p. 904-909.

TAVIRA, Carlos, ORTEGA, Angélica, DÁVILA, Idalia, ESTRADA, Sandino, MENESES, Angélica. Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. *Revista mexicana de Ciencias farmacéuticas*, 2009, vol. 40, n° 4, p. 35-46.

TAYLOR, Milton. A history of cell culture. In *Viruses and man: a history of interactions*. Springer, Cham, 2014, vol. 1, n° 1, p. 41-52.

TRASORRAS, V., GIULIANO, S. and MIRAGAYA, M. In vitro production of embryos in South American camelids. *Animal reproduction science*, 2013, vol. 136, n° 3, p. 187-193.

UYAR, Asli, TORREALDAY, Saioa and SELI, Emre. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertility and sterility*, 2013, vol. 99, n° 4, p. 979-997.

VALENCIA, Nicasio, CHÁVEZ, Amanda, GARCÍA, Mario, SUÁREZ, Francisco and CASAS, E. Toxoplasmosis como agente causal de abortos en alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 2009, vol. 20, n° 2, p. 312-319.

VALLEJO, J., GÓMEZ-PIQUER, V. and TARÍN, J. Inducción de la partenogénesis en ovocitos de mamíferos. *Rev Iberoam Fert*, 2003, vol. 20, n° 1, p. 177-187.

VARRAS, Michail, GRIVA, Theodora, KALLES, Vasileios, AKRIVIS, Christodoulos and PAPARISTEIDIS, Nikolaos. Markers of stem cells in human ovarian granulosa cells: is there a clinical significance in ART?. *Journal of ovarian research*, 2012, vol. 5, n° 1, p. 36.

VAUGHAN, J., MACMILLAN, K. and D'OCCHIO, M. Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Animal reproduction science*, 2004, vol. 80, n° 3-4, p. 353-361.

YADAV, Monica, AGRAWAL, Himanshu, PANDEY, Mamta, SINGH, Dheer and ONTERU, Suneel. Three-dimensional culture of buffalo granulosa cells in hanging drop mimics the preovulatory follicle stage. *Journal of cellular physiology*, 2018, vol. 233, n° 3, p. 1959-1970.

YENUGANTI, Vengala and VANSELOW, Jens. Cultured bovine granulosa cells rapidly lose important features of their identity and functionality but partially recover under long-term culture conditions. *Cell and tissue research*, 2017, vol. 368, n° 2, p. 397-403.

ZHOU, Yufeng. The Application of Ultrasound in 3D Bio-printing. *Molecules*, 2016, vol. 21, n° 5, p. 590.

XI. ANEXO

Tabla 8. Monitoreo de la vitalidad previo y posterior a la etapa de purificación de las CGM (pre y post-Percoll); y durante el cultivo de 168 h de las CGM

Muestra	N° Ovarios	N° Ovocitos	Vitalidad (%)						
			Pre Percoll	Post Percoll (0 h)	48 h	72 h	120 h	144 h	168 h
1	29	35	36.87	26.29				35	62
2	22	27	31.67	76.92				35	70
3	56	80	72.41	23.97		50.25		91.16	90
4	63	146	17.76	58.46	53.11		50.52		94.25
5	31	28	61.66	41.4					38
6	34	33	25.39	19.94					20
7	47	83	81.27	57.45					9.88
8	33	43	57.53	39.7			24.15		75
9	22	24	31.21	64.71					72
10	22	63	46.53	20.83		70			65
11	31	28	62.8	73.96	60				64.6
12	45	40	83.93	50.24		22.03		34.8	45
13	24	26	82.08	59.81	33.33		76,2		87.95
14	33	20	72.34	70.12		57.45		31.25	40
15	30	44	88	35.29	66.67		85.52	72.61	
Total	522	720							

Tabla 9. Monitoreo de la concentración celular previo y posterior a la etapa de purificación de las CGM (pre y post-Percoll); y durante el cultivo de 168 h de las CGM

Muestra	N° Ovarios	N° Ovocitos	Concentración (Millones/mL)						
			Pre Percoll	Post Percoll (0 h)	48 h	72 h	120 h	144 h	168 h
1	29	35	16	6				2.5	6
2	22	27	3.2	1				3.5	4
3	56	80	27.8	3.3		9		9	2.61
4	63	146	68	36	17.5		18		1.2
5	31	28	5	2.6					2.5
6	34	33	3.3	3					2.3
7	47	83	46.9	2.6					3.9
8	33	43	19	11			21		0.5
9	22	24	4,5	0.5					1
10	22	63	12	3		0.6			0.1
11	31	28	32	12	0.35				7.7
12	45	40	20,9	6,05		1		1.5	4.2
13	24	26	7.9	1.65	1		1.1		2.5
14	33	20	7.2	6.6		0.5		1.4	0.1
15	30	44	12.4	9.95	0.1		0.3	0.3	
Total	522	720							

Tabla 10. Monitoreo de la vitalidad durante el cultivo de 144 h de las CC

Muestra	N° Ovocitos	Vitalidad (%)				
		24 h	48 h	96 h	120 h	144 h
12	33		56.21		78.95	92.31
13	15	20		60	71.23	
15	11	25		66.67	96.97	

Tabla 11. Monitoreo de la concentración celular durante el cultivo de 144 h de las CC

Muestra	N° Ovocitos	Concentración (Millones/mL)				
		24 h	48 h	96 h	120 h	144 h
12	33		0.1		0.2	0.4
13	15	0.05		0.2	0.4	
15	11	0.1		0.4	0.1	

Tabla 12. Porcentaje de la maduración ovocitaria del grupo control y tratamiento CGM

Muestra	N° Ovarios	N° Ovocitos	N° CGM por ovocito	% de maduración	
				Grupo control (ovocito sin co-cultivo)	Grupo tratamiento CGM (co-cultivo ovocito-CGM)
2	22	21	15 000	42.86%	50.00%
4	63	146	6 000	23.24%	25.00%
5	31	27	74 571	35.71%	28.57%
6	34	29	40 000	44.44%	45.00%
7	47	82	4 900	6.25%	4.00%
10	22	63	1 000	5.88%	3.45%
11	31	28	4 000	15.38%	14.29%
12	45	40	333	3.03%	57.14%
13	24	26	2 567	26.67%	9.09%
14	33	10	42 000	40.00%	0.00%
15	30	21	16 667	0.00%	22.22%
Total	382	493	% de maduración Total	18.35%	18.64%

Tabla 13. Porcentaje de la maduración ovocitaria del grupo control y tratamiento CC

Muestra	N° Ovarios	N° Ovocitos	N° CC por ovocito	% de maduración	
				Grupo control (ovocito sin co-cultivo)	Grupo tratamiento CC (Co-cultivo ovocito-CC)
14	33	10	4 000	40.00%	40.00%
15	30	23	2 667	0.00%	9.09%
Total		33	% de maduración Total	11.76%	18.75%

Tabla 14. Porcentaje del desarrollo embrionario de los ovocitos del grupo control y tratamiento CGM

Muestra	N° Ovocitos seleccionados	Procedimiento	% de maduración	
			Control (ovocito sin co-cultivo)	Tratamiento CGM (Co-cultivo ovocito-CGM)
2	21	Activación química	42.86%	50.00%
4	146	Activación química	16.20%	0.00%
5	27	Activación química	14.29%	30.77%
6	29	Activación química	44.44%	45.00%
7	82	Fertilización <i>in vitro</i>	6.25%	4.00%
12	5	Fertilización <i>in vitro</i>	0.00%	75.00%
13	14	Activación química	0%	0%
Total	324			