Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

Evaluación del efecto de la melatonina en la maduración de ovocitos de *Vicugna pacos* de Huancavelica

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Héctor Josué ZEÑA CARRASCO

ASESOR

Dra. Martha Esther VALDIVIA CUYA

Lima, Perú

2025



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

Zeña, H. (2025). *Evaluación del efecto de la melatonina en la maduración de ovocitos de Vicugna pacos de Huancavelica*. [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	Héctor Josué Zeña Carrasco
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	72885200
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-0947-7991
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Dra. Martha Esther Valdivia Cuya
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	06449624
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-8301-5536
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Mg. Fernando Octavio Retuerto Prieto
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08212301
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Jose Luis Rafael Pino Gaviño
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25594149
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Jorge Antonio Zeballos Alva
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07544388

Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.3.4. Reproducción
Grupo de investigación	Biotecnología Reproductiva para la conservación y mejora genética animal (BIOTRA)
Agencia de financiamiento	Perú. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT). Convenio de Subvención N° 428-2019-FONDECYT
Ubicación geográfica de la investigación	Laboratorio de Fisiología de la Reproducción País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Av. Carlos Germán Amezaga 375 Latitud: -12.0583333 Longitud: -77.0833333
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Setiembre 2022 - Noviembre 2023
URL de disciplinas OCDE	Biología Reproductiva https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.08

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 BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN PRESENCIAL DE TESIS)

Siendo las 14:10 horas del 17 de noviembre de 2025, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **HÉCTOR JOSUÉ ZEÑA CARRASCO.**

Luego de dar lectura y conformidad al expediente **N.° UNMSM-20250052695**, el titulando expuso su Tesis: **EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA MELATONINA EN LA MADURACIÓN DE OVOCITOS DE *Vicugna pacos* DE HUANCAVELICA** 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 Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **HÉCTOR JOSUÉ ZEÑA CARRASCO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo Título, conforme a ley.

Siendo las 15:16 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 17 de noviembre de 2025.

Mg. FERNANDO OCTAVIO RETUERTO PRIETO
(PRESIDENTE)

Dra. MARTHA ESTHER VALDIVIA CUYA
(ASESORA)

Blgo. JORGE ANTONIO ZEBALLOS ALVA
(MIEMBRO)

Blgo. JOSE LUIS RAFAEL PINO GAVIÑO
(MIEMBRO)

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE
SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

Anexo 1
CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Martha Esther Valdivia Cuya en mi condición de asesora acreditada con el **Dictamen de la Escuela Profesional N° 007-2025-EPGBT-FCB** de la tesis, cuyo título es

"Evaluación del efecto de la melatonina en la maduración de ovocitos de *Vicugna pacos* de Huancavelica" presentado por el Bachiller Hector Josue ZEÑA CARRASCO para optar el título profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo.

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el 16..% de similitud, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del título profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo.

Lima, 1 de Noviembre de 2025

UNMSM
Firmado digitalmente por VALDIVIA CUYA Martha Esther FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 01.11.2025 19:52:53 -05:00

Firma del Asesor _____

Nombres y Apellidos del asesor: Martha Esther Valdivia Cuya

DNI: 06449624

* Según corresponda: bachiller, magíster, doctor; título profesional o título de segunda especialidad

La vigencia del presente certificado corresponde a un período de noventa (90) días desde la fecha de su emisión; siempre que no haya observaciones en el texto durante el proceso de revisión por el jurado informante o surja alguna contingencia

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

Dedicatoria

A mis padres

Por ser el código genético que dio origen a mi existencia y el medio de cultivo que nutrió mis sueños.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

Agradecimientos

En esta etapa tan significativa de mi formación profesional, quiero expresar mi profundo agradecimiento a quienes hicieron posible la culminación de esta tesis y el cierre de una importante etapa en mi vida.

A mis padres, Héctor y Raquel, por su amor incondicional, su esfuerzo incansable y su constante apoyo a lo largo de toda mi carrera. Su ejemplo y sacrificio han sido mi mayor motor para seguir adelante.

A mis hermanos, Brandon y Ximena, por ser referentes de perseverancia, constancia y organización. Su ejemplo ha sido una guía silenciosa, pero poderosa durante este camino.

A la Dra. Martha Valdivia, mi asesora de tesis, por brindarme la oportunidad de integrarme a su laboratorio, por su guía generosa y por su paciencia a lo largo de todo este proceso. Esta tesis representa también el cumplimiento de la promesa que le hice el primer día que ingresé a su laboratorio.

Al Dr. Zezé Bravo, amigo y mentor, por haberme acompañado con compromiso en cada paso del desarrollo experimental. Gracias por compartir sus conocimientos, por su disposición constante y por las largas horas de trabajo que dedicamos juntos, incluso hasta altas horas de la noche.

A Brizza, por su apoyo comprometido durante casi todo el proceso experimental. Su compañía alivió muchas cargas y permitió que este trabajo avanzara con mayor solidez.

A Irán, por haber sido una de las primeras personas en confiar en mí como estudiante y por motivarme a seguir en esta línea de investigación. Su interés genuino en el área fue una inspiración en mis primeros pasos.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

A quienes formaron parte de la línea de investigación en ovocitos: Tania, Patricia y Diego. Su trabajo previo sentó bases importantes para el desarrollo de esta tesis, y sus aportes han sido fundamentales para alcanzar los resultados que hoy presento.

Esta tesis fue financiada por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, RR N° 05753-R-21, Código N°B21100071 y el proyecto PROCIENCIA-FONDECYT 428-2019.

A todos ustedes, gracias por haber sido parte de este recorrido. Este logro no habría sido posible sin su apoyo.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

TABLA DE CONTENIDO

1 INTRODUCCIÓN 1

2 MARCO TEÓRICO 4

2.1 La alpaca (*Vicugna pacos*) 4

2.2 Fisiología reproductiva 5

2.3 Foliculogénesis 6

2.4 Ovogénesis 10

2.5 Maduración *in vivo* del ovocito 11

2.6 Aspiración de ovocitos 11

2.7 Clasificación y selección de ovocitos 12

2.8 Cultivo para maduración *in vitro* 13

2.9 Activación química partenogenética 13

2.10 Desarrollo embrionario partenogenético 14

2.11 Melatonina 15

2.12 Fluorescencia en ovocitos 15

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 17

3.1 Hipótesis 17

3.2 Objetivos 17

3.2.1 Objetivo general 17

3.2.2 Objetivos específicos 17

4 MATERIALES Y MÉTODOS 18

4.1 Materiales 18

4.1.1 Material biológico 18

4.1.2 Medios de cultivo y reactivos 18

4.1.3 Equipos y materiales de laboratorio 20

4.2 Métodos 21

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

4.2.1 Colecta de ovarios y ejecución del estudio 21

4.2.2 Obtención de ovocitos 21

4.2.3 Selección de ovocitos 21

4.2.4 Maduración de ovocitos 21

4.2.5 Evaluación de la maduración de ovocitos 22

4.2.6 Evaluación de ROS 22

4.2.7 Evaluación de competencias de los ovocitos maduros 23

4.2.8 Cultivo de embriones 23

4.2.9 Valoración del desarrollo embrionario 23

4.2.10 Análisis estadístico 24

5 RESULTADOS 25

5.1 Ovocitos aislados 25

5.2 Efecto de la suplementación del medio de maduración con melatonina sobre la tasa de maduración *in vitro* 25

5.3 Efecto de la suplementación del medio de maduración con melatonina sobre el ROS en ovocitos post maduración *in vitro* 27

6 DISCUSIÓN 29

7 CONCLUSIONES 33

8 RECOMENDACIONES 34

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 35

10 ANEXOS 42

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Promedio de ovocitos aislados por ovario 25

Tabla 2. Tasas de desarrollo embrionario en diferentes estadios 26

Tabla 3. Número de ovarios y ovocitos de categoría 1 y 2 recuperados por fecha 46

Tabla 4. Número de ovocitos maduros obtenidos tasa de maduración por tratamiento y fecha 46

Tabla 5. Número de embriones obtenidos y tasa de activación de ovocitos por tratamiento y fecha 47

Tabla 6. Número de blastocistos obtenidos y tasa de blastulación de embriones por tratamiento y fecha 49

Tabla 7. Número de ovocitos sometidos a fluorescencia con DCFDA 49

Tabla 8. Resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk 50

Tabla 9. Resultados de prueba ANOVA entre grupos 50

Tabla 10. Resultados de prueba post hoc de comparaciones múltiples Tukey 51

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático del desarrollo folicular. Tomado de Turathum et al., 2021. 9

Figura 2. Ovocitos post maduración in vitro en fluorescencia con indicador DCFDA (200X). 28

Figura 3. Envase de traslado de la muestra biológica 42

Figura 4. Ovario de alpaca 5X 42

Figura 5. Obtención de ovocitos por método de aspiración folicular 43

Figura 6. Medios en placa de cultivo 43

Figura 7. Ovocitos obtenidos por aspiración y seleccionados para maduración in vitro: Clase 1 (flecha negra) y clase 2 (flecha azul). 20X 44

Figura 8. Desarrollo embrionario. A. Ovocito maduro con presencia de cuerpo polar (flecha negra). B. Embrión de 2 células. C. Embrión en estadio de mórula. D. Embrión en estadio de blastocisto. E. Embrión en hatching. F. Embrión hatched o eclosionado. Aumento 200X. 45

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Tasas de maduración ovocitaria en diferentes concentraciones de melatonina..... 26

Gráfico 2. Tasas de activación ovocitaria en diferentes concentraciones de melatonina 27

Gráfico 3. Tasas de blastulación en diferentes concentraciones de melatonina..... 27

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

ABREVIATURAS

MIV: Maduración *in vitro*

FIV: Fertilización *in vitro*

ROS: Especies reactivas de oxígeno

PBS: Buffer fosfato salino

BSA: Albúmina sérica bovina

SBF: Suero fetal bovino

aaKSOM: Medio optimizado simple de potasio + aminoácidos

6-DMAP: 6-dimetilaminopurina

EGF: Facto de crecimiento epidérmico

FSH: Hormona folículo estimulante

LH: Hormona luteinizante

DCFDA: 2',7'-diclorofluoresceína 3',6'-diacetato

RE: Retículo endoplasmático

SOD: Superóxido dismutasa

GSH: Glutatión peroxidasa

RE: Retículo endoplasmático

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

RESUMEN

La reproducción en la alpaca (*Vicugna pacos*) enfrenta múltiples desafíos debido a su particular fisiología reproductiva y a la ausencia de protocolos eficientes para la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos. La baja tasa de maduración ovocitaria y las limitaciones en la obtención de embriones viables han obstaculizado el desarrollo de biotecnologías reproductivas en esta especie, lo que afecta directamente la productividad y la mejora genética del rebaño. En este contexto, la melatonina, una hormona con propiedades antioxidantes y reguladoras del ciclo circadiano, ha demostrado tener un papel clave en la protección celular contra el estrés oxidativo y en la mejora de la calidad ovocitaria en diversas especies.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la melatonina en la maduración de ovocitos de alpacas maduras obtenidos desde ovarios colectados en el Camal Municipal de Huancavelica. Los ovocitos fueron aislados y sometidos a diferentes concentraciones de melatonina en medios de cultivo diseñados para optimizar su desarrollo. Se analizaron parámetros como la viabilidad ovocitaria, las tasas de maduración, activación y desarrollo embrionario mediante microscopía de contraste de fases y fluorescencia para determinar el estrés oxidativo.

Los resultados mostraron que la adición de melatonina en concentración 10^{-7} incrementó la tasa de blastulación en comparación con el grupo control, sugiriendo un efecto protector contra el estrés oxidativo. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la maduración ni activación de los ovocitos tratados con melatonina.

Estos hallazgos sugieren que la melatonina podría ser utilizada como un suplemento efectivo en los protocolos de MIV para ovocitos de alpaca, contribuyendo al desarrollo de estrategias de mejora reproductiva en esta especie. Se recomienda realizar estudios adicionales para determinar las concentraciones óptimas de melatonina y evaluar su impacto en etapas posteriores del desarrollo embrionario.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

Palabras clave: alpaca, maduración *in vitro*, ovocitos, melatonina, biotecnología reproductiva.

ABSTRACT

Reproduction in alpacas (Vicugna pacos) faces multiple challenges due to its particular reproductive physiology and the lack of efficient protocols for *in vitro* oocyte maturation (IVM). The low oocyte maturation rate and limitations in obtaining viable embryos have hindered the development of reproductive biotechnologies in this species, directly affecting the productivity and genetic improvement of the herd. In this context, melatonin, a hormone with antioxidant and circadian cycle-regulating properties, has proven to play a key role in cellular protection against oxidative stress and in the enhancement of oocyte quality in various species.

The present study aimed to evaluate the effect of melatonin on oocyte maturation in alpacas obtained from ovaries collected in the municipal slaughterhouse in Huancavelica. Oocytes were isolated and subjected to different melatonin concentrations in culture media designed to optimize their development. Parameters such as oocyte viability, maturation rates, activation, and embryonic development were analyzed through phase contrast and fluorescence microscopy to determine oxidative stress.

The results showed that the addition of melatonin at a concentration of 10^{-7} increased the blastulation rate compared to the control group, suggesting a protective effect against oxidative stress. However, no significant differences were observed in the maturation or activation of oocytes treated with melatonin.

These findings suggest that melatonin could be used as an effective supplement in IVM protocols for alpaca's oocyte, contributing to the development of reproductive improvement strategies in this species. Further studies are recommended to determine the optimal concentrations of melatonin and assess its impact on later stages of embryonic development.

Keywords: alpaca, *in vitro* maturation, oocytes, melatonin, reproductive biotechnology.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

1 INTRODUCCIÓN

La alpaca (Vicugna pacos) es un camélido sudamericano domesticado propio de las zonas altoandinas, con mayor presencia en Perú, pero también distribuido en Bolivia, Chile y Argentina. Esta especie es principalmente criada por comunidades rurales de regiones como Puno, Cusco, Arequipa y Huancavelica, donde la altitud y el clima han favorecido su adaptación, permitiendo su desarrollo y reproducción (Flores & Valdivia, 2017). La alpaca tiene una gran importancia económica, ya que su fibra es altamente valorada, en los mercados internacionales, debido a su calidad, suavidad y capacidad térmica. Según estudios recientes, la industria de la fibra de alpaca contribuye significativamente a la economía de Perú, siendo uno de los principales productos de exportación (Mendoza et al., 2018). Sin embargo, el mal manejo en su crianza plantea desafíos importantes. Entre los problemas más críticos se encuentra la reproducción ineficiente, agravada por la falta de programas genéticos y reproductivos adecuados (Flores et al., 2020). Las alpacas presentan una baja tasa de fertilidad, y la alta incidencia de cruces consanguíneos en algunas regiones compromete la viabilidad y el rendimiento productivo de las crías, incrementando la susceptibilidad a enfermedades (Mamani, 2019). Este manejo inadecuado se ve también reflejado en la escasa capacitación técnica y profesional que reciben los productores, lo que empeora las condiciones de salud animal y afecta la productividad (Quispe & Gómez, 2021).

El desarrollo de biotecnologías reproductivas ha sido una de las respuestas más prometedoras para enfrentar los problemas reproductivos que afectan a las alpacas en el Perú. Dado que las tasas de fertilidad en esta especie son relativamente bajas, especialmente en condiciones de manejo tradicional, se han implementado varias técnicas para mejorar la productividad. Entre ellas, la inseminación artificial y la transferencia de embriones han mostrado avances significativos (Flores et al., 2020). Estas biotecnologías permiten no solo incrementar el número de crías por hembra, sino también mejorar la calidad genética del rebaño mediante la selección de los mejores

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

ejemplares, lo que es crucial para reducir la consanguinidad y las enfermedades hereditarias que afectan la productividad de las alpacas (Huanca et al., 2019).

La maduración *in vitro* (MIV) de óvulos en alpacas es una técnica que aún enfrenta limitaciones significativas, tanto en términos de eficiencia como de aplicación. A diferencia de otras especies, los ovocitos de alpacas presentan una tasa de maduración más baja cuando se cultivan en condiciones *in vitro*. Esto se debe en parte a las características propias de los ovocitos de camélidos, que requieren condiciones específicas de cultivo y medios especializados para completar su maduración (Huanca et al., 2020). Aunque los avances en medios de cultivo han mejorado parcialmente los resultados, la MIV en alpacas sigue siendo un proceso complejo, con tasas de maduración que varían entre el 30% y el 50%, lo que es considerablemente inferior a otras especies de ganado (García et al., 2019). Este bajo rendimiento se debe, en gran medida, a la escasa comprensión de los requerimientos fisiológicos específicos de los ovocitos de alpaca, lo que limita el desarrollo de medios óptimos para su maduración.

Además, la obtención *in vitro* de embriones en alpacas también enfrenta varios obstáculos. Los procesos de fecundación *in vitro* (FIV) y desarrollo embrionario han mostrado resultados inconsistentes. En particular, los embriones producidos *in vitro* a menudo no alcanzan las etapas de desarrollo blastocisto, lo que reduce la viabilidad de los embriones para ser transferidos exitosamente a hembras receptoras (González & Valverde, 2017). Así mismo, tasa de desarrollo embrionario en condiciones *in vitro* es baja, con menos del 20% de los óvulos fecundados llegando a etapas avanzadas de desarrollo (Cárdenas et al., 2018). Estos desafíos se deben no solo a las dificultades en la MIV y FIV, sino también a la falta de infraestructura y tecnología en las zonas donde se crían las alpacas, lo que restringe la aplicación de estas técnicas a nivel comercial (González & Valverde, 2017).

El uso de antioxidantes ha surgido como una estrategia prometedora para mejorar las tasas de maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos de alpaca y favorecer la obtención de

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

embriones con mayor potencial de desarrollo. En ese sentido, este estudio propone la adición de melatonina a los medios de cultivo, la cual podría mejorar la competencia ovocitaria, al reducir los efectos del estrés oxidativo y promover un entorno más favorable para el desarrollo celular (Zambrano & Mamani, 2020). Es necesario realizar una investigación que determine las concentraciones óptimas de melatonina y las condiciones específicas de cultivo que maximicen sus efectos beneficiosos en los ovocitos de alpaca.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

2 MARCO TEÓRICO

2.1 La alpaca (*Vicugna pacos*)

La alpaca (*Vicugna pacos*) es un camélido sudamericano domesticado hace aproximadamente 6,000 años por las culturas preincaicas en los Andes, particularmente en lo que hoy es Perú (Wheeler, 2019; Kadwell et al., 2001). Su origen se vincula directamente con la vicuña, uno de sus parientes salvajes más cercanos, con la que comparte muchas características genéticas y morfológicas. La domesticación de la alpaca permitió a las antiguas culturas andinas aprovechar su valiosa fibra, una de las más finas y apreciadas del mundo, así como utilizarla en la producción de textiles ceremoniales y para el abrigo en altitudes andinas (Wheeler, 2019).

En cuanto a su taxonomía, la alpaca pertenece a la familia Camelidae, junto con otras especies de camélidos sudamericanos como la vicuña (*Vicugna vicugna*), la llama (*Lama glama*) y el guanaco (*Lama guanicoe*). Existen dos razas principales de alpaca: la Huacaya, que tiene una fibra densa y esponjosa, y la Suri, que posee un vellón más largo y sedoso (Quispe et al., 2017). Estas razas son criadas principalmente por comunidades rurales en la región altoandina, en altitudes que van desde los 3,500 hasta los 5,000 metros sobre el nivel del mar. En estas condiciones de bajas temperaturas y escasez de oxígeno, la alpaca constituye un recurso fundamental para la subsistencia de dichas comunidades (González et al., 2020).

La distribución geográfica de la alpaca se centra en Perú, país que alberga aproximadamente el 80% de la población mundial, seguido por Bolivia, Ecuador y Chile. Desde la década de 1980, la cría de alpacas se ha expandido fuera de Sudamérica hacia países como Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Países Bajos, Sudáfrica y China, donde han encontrado nichos productivos principalmente orientados a la industria textil y de fibras finas.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

En Perú, las alpacas se concentran principalmente en las regiones de Puno, Cusco, Arequipa y Huancavelica (Quispe et al., 2017). Según estimaciones recientes, la población de alpacas en Perú supera los 3.7 millones de ejemplares, lo que convierte a este país en el mayor productor de fibra de alpaca a nivel mundial (INEI, 2020).

A pesar de su relevancia económica y cultural, la población de alpacas enfrenta desafíos debido a factores como la reducción de pastizales, el cambio climático y la falta de programas de manejo genético adecuados. Estas amenazas, junto con los problemas reproductivos previamente mencionados, limitan el crecimiento y la sostenibilidad de la población en algunas regiones (Flores & Mamani, 2021). Por ello, se continúan desarrollando investigaciones y políticas destinadas a la preservación y optimización de la crianza de esta especie, dada su importancia tanto para la biodiversidad como para las economías rurales de los Andes.

2.2 Fisiología reproductiva

La fisiología reproductiva de la alpaca presenta características particulares que la distinguen de otros rumiantes y camélidos sudamericanos. Una de las diferencias más significativas es que la alpaca es una especie de ovulación inducida; es decir, no tiene un ciclo estral típico como muchas otras especies, sino que ovula en respuesta al estímulo físico de la cópula (Bravo et al., 2013). La estimulación mecánica del tracto reproductivo femenino, junto con la acción de un factor ovulatorio presente en el plasma seminal del macho, son elementos cruciales para desencadenar la ovulación (Silva et al., 2014). Este factor ovulatorio, identificado como una proteína similar a la β-nerve growth factor (β-NGF), actúa a nivel neuroendocrino estimulando la liberación de la hormona luteinizante (LH), que a su vez induce la ovulación. Como resultado de este mecanismo, las hembras pueden estar receptivas para el apareamiento en cualquier momento del año, siempre que estén en condiciones de salud adecuadas y no se encuentren gestando (Ratto et al., 2012).

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

El ciclo estral de la alpaca se caracteriza por una rápida dinámica folicular. El ovario presenta ondas de crecimiento de folículos dominantes que, en ausencia de una ovulación inducida por la cópula, sufren atresia en un intervalo aproximado de 12 a 14 días. Este patrón repetitivo genera múltiples oportunidades de apareamiento, aunque la reproducción efectiva solo ocurre cuando la ovulación es desencadenada por el estímulo seminal (Wiedner, 2021). Tras la cópula, la ovulación ocurre aproximadamente entre las 26 y 30 horas posteriores (Bravo et al., 2013). La gestación en alpacas tiene una duración promedio de 11 a 12 meses, y generalmente, solo producen una cría, ya que los casos de gemelos son extremadamente raros debido a las limitaciones de espacio en el útero y la alta tasa de mortalidad en estas situaciones (Rivera et al., 2018).

Un aspecto notable en la fisiología reproductiva de la alpaca es la capacidad del cuerpo lúteo para mantener niveles elevados de progesterona durante la gestación, lo que es esencial para el mantenimiento del embarazo. No obstante, problemas reproductivos como la muerte embrionaria temprana, que se da entre el 10% y 15% de los casos, son comunes y afectan la productividad de la especie (González et al., 2019). Esta alta tasa de mortalidad embrionaria se ha relacionado con factores como el estrés ambiental, enfermedades infecciosas y deficiencias nutricionales, que comprometen la viabilidad del embrión.

La fisiología reproductiva de la alpaca, aunque bien adaptada a las condiciones de gran altitud, presenta desafíos que impactan su eficiencia reproductiva. Estos problemas, junto con la falta de conocimiento técnico en muchas zonas de cría, resaltan la necesidad de seguir desarrollando estrategias de manejo reproductivo más avanzadas para mejorar la tasa de éxito en la reproducción de esta especie.

2.3 Foliculogénesis

La foliculogénesis en alpacas es un proceso dinámico y continuo que, al igual que en otros mamíferos, involucra el crecimiento y maduración de los folículos ováricos desde

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

su estado primordial hasta su maduración final. A diferencia de las especies con ciclos estrales regulares, las alpacas presentan un patrón de foliculogénesis caracterizado por la presencia de oleadas continuas de crecimiento folicular, lo que las convierte en ovuladoras continuas (García et al., 2020). En este proceso, varios folículos comienzan su desarrollo de forma simultánea, pero solo uno o algunos alcanzan el tamaño preovulatorio (Huanca et al., 2021). Sin el estímulo de la cópula, los folículos dominantes regresionan sin liberar un óvulo, y el ciclo folicular se reinicia (Combelles, 2013).

El crecimiento de los folículos ocurre en oleadas de 12 a 14 días, lo que permite la constante presencia de folículos en diferentes etapas de maduración dentro del ovario (Ratto et al., 2019). Este patrón continuo es clave para su capacidad de estar receptivas a la reproducción en cualquier momento, dependiendo de la inducción de la ovulación. En alpacas, los folículos de Graaf pueden alcanzar un tamaño de entre 7 a 12 mm antes de la ovulación, y el folículo dominante es el que responde a la liberación de la hormona luteinizante (LH) tras el estímulo de la cópula (Ratto et al., 2021).

Uno de los principales factores que afecta la foliculogénesis en alpacas es el manejo nutricional y las condiciones ambientales. El estrés asociado a la gran altitud y la variabilidad de los recursos alimenticios puede influir en la calidad y el desarrollo de los folículos, afectando directamente la capacidad reproductiva de la hembra (Quispe et al., 2018). Además, los desequilibrios hormonales inducidos por factores ambientales pueden comprometer el desarrollo folicular, provocando su regresión prematura o reduciendo la capacidad de respuesta a los estímulos ovulatorios (Bravo et al., 2020).

En términos hormonales, la foliculogénesis en alpacas está fuertemente regulada por la interacción entre la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). La FSH es responsable del reclutamiento de los folículos, mientras que la LH, en niveles adecuados tras la cópula, induce la ovulación (Ratto et al., 2019), liberando la LH desde la glándula pituitaria para desencadenar la ruptura del folículo dominante y la liberación del ovocito (Silva et al., 2019).

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

La clasificación de los folículos ováricos en alpacas, como en otros mamíferos, se basa en su tamaño, desarrollo y morfología. Los folículos se dividen en varias etapas que reflejan su progreso desde un estado inmaduro hasta la preparación para la ovulación. Estas etapas son: primordial, primario, secundario, terciario, y preovulatorio (dominante) (García et al., 2020).

1. **Folículo primordial**: Es el folículo más inmaduro y pequeño, compuesto por un ovocito rodeado por una sola capa de células foliculares planas. Estos folículos se encuentran en estado latente en los ovarios, generalmente ubicados en la periferia cortical, y la mayoría no llegan a desarrollarse; sin embargo, representan la reserva ovárica de la hembra (Ratto et al., 2019).

2. **Folículo primario**: Corresponde al inicio de la activación folicular. El ovocito aumenta de tamaño y queda rodeado por una capa de células de la granulosa cúbicas; comienza a formarse la zona pelúcida y se inicia la diferenciación de la teca. El ovocito también comienza a aumentar de tamaño. Este es el primer signo de desarrollo activo del folículo.

3. **Folículo secundario**: Se caracteriza por la proliferación de células de la granulosa, que rodean el ovocito en múltiples capas (generalmente entre 2 y 6 en etapas tempranas). Durante esta etapa, comienza la organización de las células estromales periféricas en la estructura conocida como teca folicular, aunque su diferenciación en teca interna y externa se hace más evidente en etapas posteriores, particularmente en el folículo terciario o antral. Esta estructura contribuye tanto al soporte estructural como a la producción de hormonas esteroides que regulan el desarrollo folicular (Huanca et al., 2021).

4. **Folículo terciario o antral**: Se caracteriza por la formación de cavidades llenas de líquido folicular (*antros*), que inicialmente pueden ser múltiples y de pequeño tamaño. A medida que el desarrollo progresa, estos espacios confluyen para

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

formar un antro único de mayor tamaño. En esta etapa, el folículo responde a la acción de la FSH, que promueve tanto la proliferación de células de la granulosa como el crecimiento folicular sostenido. (Quispe et al., 2018; Huanca et al., 2021a).

5. **Folículo preovulatorio o dominante**: Este es el folículo que ha alcanzado el mayor desarrollo y está listo para ovular tras la estimulación adecuada, como la inducción de la hormona luteinizante (LH) en respuesta a la cópula en el caso de las alpacas, que son ovuladoras inducidas. El folículo preovulatorio o dominante es de mayor tamaño que los demás, y es el que finalmente liberará un ovocito maduro durante la ovulación (Silva et al., 2019).

En alpacas, el proceso de selección del folículo dominante se da de manera similar a otros mamíferos, aunque no hay una sincronía estral estricta, dado que los folículos maduran en oleadas continuas. Si no ocurre la ovulación, el folículo dominante experimenta atresia (regresión) y es reemplazado por otro folículo en el siguiente ciclo de desarrollo. Esta dinámica folicular constante es esencial para mantener la receptividad reproductiva durante todo el año (Bravo et al., 2020).

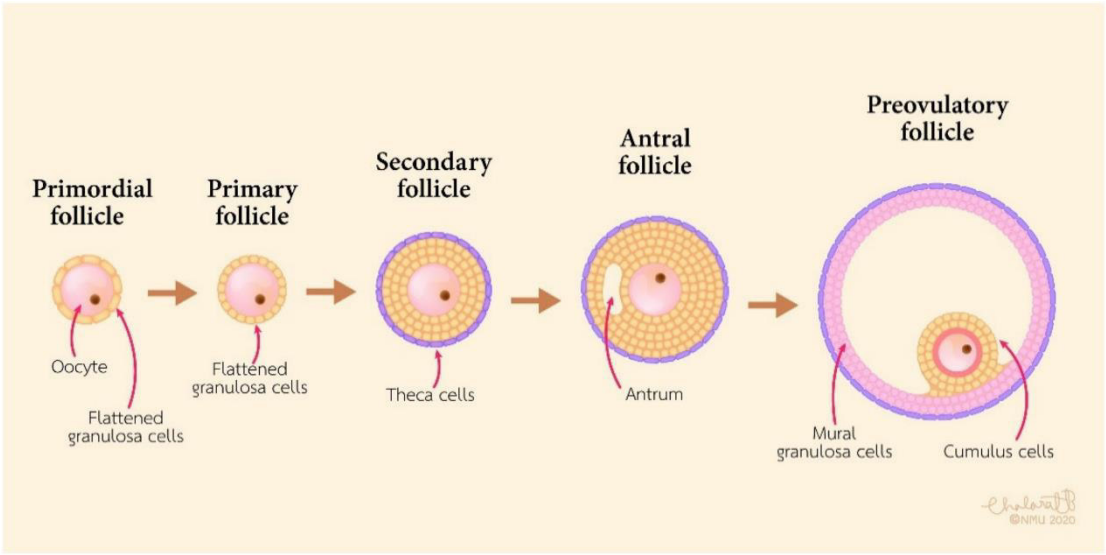


Figura 1. Diagrama esquemático del desarrollo folicular. Tomado de Turathum et al., 2021.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

2.4 Ovogénesis

La ovogénesis es un proceso complejo que se inicia durante la vida embrionaria, cuando las células germinales primordiales migran al ovario y se diferencian en ovogonias. A través de sucesivas mitosis, estas células se multiplican, alcanzando su máximo número alrededor de la mitad de la gestación. Posteriormente, algunas ovogonias se transforman en ovocitos primarios que inician la meiosis, pero se detienen en la fase de diploteno hasta la pubertad. En especies con ovulación espontánea, como los humanos, estos ovocitos reanudan su desarrollo en cada ciclo estral o menstrual bajo la influencia de la hormona folículo estimulante (FSH), completando la primera división meiótica y generando un ovocito secundario y un cuerpo polar, ambos haploides (Gougeon, 2018). Este proceso es regulado por hormonas como la FSH y la LH, las cuales promueven el crecimiento del folículo y la maduración del ovocito hasta su liberación en la ovulación (Sharma & Teklehaimanot, 2020).

El ovocito en desarrollo se rodea de células de granulosa y teca, formando el folículo, una estructura que progresa a través de distintas etapas: folículo primordial, primario, secundario y finalmente folículo De Graaf o preovulatorio. La comunicación entre el ovocito y las células de granulosa es fundamental en este proceso; por medio de uniones GAP, se transfieren factores de crecimiento como el GDF9, que facilita la transición de los folículos primordiales a los primarios, permitiendo el desarrollo adecuado del ovocito (Edwards et al., 2019). A lo largo de este proceso, la mayoría de los ovocitos no alcanzan la madurez, sino que sufren atresia, fenómeno en el cual los folículos degeneran y son reabsorbidos, garantizando así que solo unos pocos ovocitos maduros lleguen a la fase de ovulación a lo largo de la vida reproductiva (Skinner, 2021).

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

2.5 Maduración *in vivo* del ovocito

La MIV de ovocitos es una técnica que permite llevar los ovocitos inmaduros obtenidos de los ovarios hasta la maduración necesaria para ser fecundados en un ambiente de laboratorio controlado.

Durante la MIV, los ovocitos inmaduros son cultivados en medios especializados que contienen factores de crecimiento y hormonas, como la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), que emulan el ambiente ovárico necesario para la maduración. Esta técnica permite que el ovocito complete la meiosis y se detenga en la metafase II, etapa en la cual el ovocito está listo para ser fecundado (Silva et al., 2019).

2.6 Aspiración de ovocitos

La aspiración de ovocitos a partir de ovarios provenientes de camales es una técnica utilizada en biotecnología reproductiva que permite obtener ovocitos inmaduros de hembras sacrificadas, brindando una fuente de material biológico para estudios de maduración *in vitro*, fecundación *in vitro* y producción de embriones.

La aspiración de ovocitos generalmente se realiza en un laboratorio, donde los ovarios extraídos en el camal se transportan bajo condiciones controladas para preservar su viabilidad. Una vez en el laboratorio, los ovarios son limpiados y los folículos de tamaño adecuado (por lo general, folículos antrales de entre 2 y 8 mm) son aspirados mediante el uso de agujas de calibre fino (18 a 20-gauge) conectadas a una bomba de vacío o una jeringa, lo que permite la recolección de líquido folicular y ovocitos (García et al., 2021).

La calidad de los ovocitos obtenidos mediante aspiración de ovarios de camales puede verse afectada por factores como el tiempo transcurrido entre el sacrificio y la aspiración, las condiciones de transporte, y el estado fisiológico de la hembra en el momento del sacrificio. Estos factores pueden reducir la viabilidad y la competencia de los ovocitos para completar la maduración y posterior desarrollo embrionario (Quispe et al., 2018).

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

2.7 Clasificación y selección de ovocitos

La selección y clasificación de los ovocitos obtenidos por aspiración es una etapa crucial en los procedimientos de reproducción asistida, especialmente en especies como la alpaca, donde la calidad del ovocito puede influir en la eficiencia de técnicas como la maduración y fecundación *in vitro*. Tras la aspiración de los folículos, los ovocitos se recogen en medios de cultivo y se someten a un proceso de evaluación para determinar su calidad y potencial de desarrollo. Esta clasificación es fundamental para optimizar los recursos y aumentar las tasas de éxito en la producción de embriones viables (García et al., 2020).

La metodología más común se basa en evaluación de la morfología del complejo cúmulos-ovocito, la cual se basa en los siguientes criterios: homogeneidad del citoplasma, grado de compactación y número de capas de las células del cúmulo. Los ovocitos que presentan más de 3 capas de células del cúmulo, así como un citoplasma homogéneo tienen mayores tasas de maduración, clivaje y formación de blastocistos (Mikkelsen y Lindenberg, 2001). Existen cuatro categorías para clasificar a los complejos cúmulo-ovocito (CCO) (Ratto et al., 2005):

- Categoría 1: Citoplasma homogéneo. Presenta de 5 a más capas compactas de células del cúmulo.

- Categoría 2: Citoplasma homogéneo. Presenta de 2 a 4 capas compactas de células del cúmulo.

- Categoría 3: Citoplasma vacuolado y parcialmente denudado.

- Categoría 4: Ovocito denudado con citoplasma granulado.

Bajo estos criterios, se recomienda el uso de los CCOs de categoría 1 y 2 para su uso en biotecnologías de reproducción.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

2.8 Cultivo para maduración *in vitro*

El medio de MIV de ovocitos proporciona las condiciones óptimas para que los ovocitos inmaduros completen su desarrollo y sean competentes para la fecundación. Este medio simula el ambiente folicular, brindando nutrientes, factores de crecimiento y hormonas esenciales para que el ovocito avance en su maduración meiótica y citoplasmática. En alpacas, debido a sus particularidades reproductivas, el diseño de un medio MIV efectivo ha sido un reto y ha requerido ajustes específicos para alcanzar resultados comparables a los obtenidos en otras especies de mamíferos domésticos (García et al., 2021).

El medio de MIV generalmente contiene componentes básicos como suero (usualmente suero fetal bovino o suero de alpaca), que aporta proteínas, y una combinación de hormonas como la hormona folículo estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH), y estradiol. Estas hormonas juegan un rol importante en la maduración oocitaria, ya que activan las vías de señalización necesarias para que el ovocito avance a través de las fases de la meiosis y alcance la metafase II, punto crítico para su fecundación (Huanca et al., 2020). Además, suelen añadirse factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que ha demostrado mejorar la competencia de maduración en ovocitos de alpaca al estimular el desarrollo citoplasmático (Quispe et al., 2018).

2.9 Activación química partenogenética

El medio para activación química de ovocitos es esencial en procedimientos de reproducción asistida, particularmente cuando se busca inducir el desarrollo embrionario sin la intervención de un espermatozoide. Este proceso, conocido como activación partenogenética, es crucial en especies con tasas bajas de fecundación *in vitro*, como las alpacas, ya que permite iniciar la división celular en ovocitos maduros mediante estímulos químicos en un ambiente controlado. En camélidos sudamericanos, los compuestos utilizados para la activación química han mostrado ser útiles para el estudio

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

del desarrollo embrionario temprano y para optimizar protocolos de fecundación asistida (Huanca et al., 2021b).

El medio para la activación química de ovocitos suele incluir agentes que desencadenan la liberación de calcio intracelular, lo cual es fundamental para iniciar la reanudación de la meiosis en el ovocito. Entre los compuestos más empleados para este fin se encuentran la ionomicina y el ionóforo de calcio A23187, que incrementan los niveles de calcio dentro de la célula y simulan la señal de activación que naturalmente se produciría tras la entrada de un espermatozoide (García et al., 2020). Otro compuesto utilizado es 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), que inhibe la activación de proteínas de maduración, facilitando la progresión a la fase de pronúcleos en los ovocitos activados (Silva et al., 2019).

2.10 Desarrollo embrionario partenogenético

El medio para el cultivo de embriones post activación química es fundamental para proporcionar las condiciones óptimas que permiten que los embriones activados se desarrollen de manera eficiente hasta alcanzar etapas avanzadas, como la de blastocisto. En el caso de la alpaca, la optimización de este medio es un desafío debido a la naturaleza de su desarrollo embrionario y a las condiciones fisiológicas específicas de esta especie. Los medios de cultivo se diseñan para simular el ambiente natural del oviducto y el útero, donde se da el desarrollo temprano del embrión, proporcionando nutrientes, factores de crecimiento, antioxidantes y un control adecuado de las condiciones de pH y temperatura (Silva et al., 2021).

Los medios de cultivo de embriones suelen incluir suero, como el suero fetal bovino o suero de alpaca, debido a su contenido en proteínas y factores de crecimiento. Este suplemento ayuda a mantener la estabilidad osmótica y facilita el desarrollo embrionario. Además, el medio generalmente contiene aminoácidos esenciales y no esenciales, que son críticos para las divisiones celulares y el metabolismo embrionario. Entre los medios

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

empleados se encuentran el SOF (Synthetic Oviduct Fluid) y el aaKSOM (Potassium Simplex Optimization Medium), que han mostrado ser adecuados para el cultivo de embriones de diferentes especies, aunque en alpacas la adaptación específica de estos medios sigue en evaluación (García et al., 2020).

2.11 Melatonina

La melatonina es un potente antioxidante que desempeña un papel fundamental en la protección de los ovocitos contra el estrés oxidativo durante la maduración *in vitro* (MIV). Su mecanismo de acción se basa en su capacidad para neutralizar directamente las especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros radicales libres, además de estimular la actividad de enzimas antioxidantes intracelulares como la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx). Estas propiedades antioxidantes contribuyen a mantener la integridad del ADN, las mitocondrias y otros orgánulos celulares, fundamentales para la calidad y viabilidad del ovocito (Silva et al., 2021).

En el contexto de la MIV de ovocitos de alpaca, la melatonina no solo protege contra el daño oxidativo, sino que también mejora las tasas de maduración meiótica. Este compuesto regula vías de señalización intracelular relacionadas con la reanudación de la meiosis, promoviendo la progresión hacia la metafase II (MII). Se ha reportado que la adición de melatonina al medio de MIV aumenta significativamente el porcentaje de ovocitos que alcanzan la MII en comparación con medios no suplementados, lo que sugiere una mejora en la competencia nuclear y citoplasmática del ovocito (Huanca et al., 2021).

2.12 Fluorescencia en ovocitos

La medición de especies reactivas de oxígeno (ROS) en ovocitos mediante fluorescencia constituye una herramienta útil para evaluar el estrés oxidativo celular, aspecto clave en el contexto de la reproducción asistida. El exceso de ROS puede dañar las estructuras celulares, afectando la viabilidad y competencia del ovocito para

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

desarrollar un embrión viable. La medición de ROS es especialmente relevante en la maduración y cultivo de ovocitos *in vitro*, ya que estas condiciones de laboratorio pueden aumentar los niveles de estrés oxidativo (Huanca et al., 2021).

Uno de los indicadores fluorescentes más utilizados para la detección de ROS en ovocitos es el 2',7'-diclorofluoresceína 3',6'-diacetato (DCFDA). Este compuesto es una molécula no fluorescente que, al penetrar en el ovocito, se desesterifica y se convierte en diclorofluoresceína (DCF), una forma activa y fluorescente que emite luz verde cuando es oxidada por ROS. De este modo, el nivel de fluorescencia generado por DCF es directamente proporcional a la concentración de ROS en el ovocito, permitiendo su cuantificación precisa (Silva et al., 2020).

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La melatonina puede favorecer la maduración de ovocitos de alpaca al reducir los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) y mejorar su competencia para el desarrollo embrionario.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la melatonina en la maduración de ovocitos de *Vicugna pacos*.

3.2.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración de melatonina que permita obtener un mayor índice de maduración de ovocitos.
- Evaluar la actividad de ROS después de la maduración ovocitaria *in vitro*.
- Comprobar la competencia de los ovocitos mediante la obtención de embriones por activación química partenogenética.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Material biológico

Se emplearon 293 ovarios de alpacas adultas sacrificadas, provenientes del Camal Municipal de Huancavelica, Perú (ubicado a 4050 m s. n. m.). Estos fueron transportados hasta el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción (LFR) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), en Lima, para su procesamiento y fueron utilizados luego de veintidós horas post mortem.

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM mediante el acta N.° 040-2023-CBE-FCB-UNMSM.

4.1.2 Medios de cultivo y reactivos

- **Transporte**

Los ovarios fueron depositados en solución salina (NaCl al 0.9 %) a una temperatura de 23 °C y transportados en el interior de un termo, el cual fue colocado dentro de una caja termoaislante de Tecnopor, para evitar cambios bruscos de temperatura.

- **Lavado de ovarios**

Para el lavado de ovarios, se empleó una solución de buffer fosfato salino (PBS) enriquecida con antibióticos. La composición incluyó 8 g/L de cloruro de calcio /L (Sigma-Aldrich S5886), 0,2 g de cloruro de potasio (Sigma-Aldrich P9333), 1,62 g/L de fosfato dibásico de sodio (Sigma-Aldrich S5136), 0,24 g/L de fosfato monobásico de potasio (SigmaAldrich, P5379), 7,5 mg/L de penicilina sódica (Sigma-Aldrich P3032) y 7,5 mg/L de estreptomicina (Sigma-Aldrich S1277)).

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

- **Aislamiento y lavado de ovocitos**

  Tanto para el aislamiento como el lavado de los ovocitos, se usó Medio 199 con Hepes (Sigma-Aldrich M2520) suplementado con 2,2 g/L de bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich S5761) 10% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich F4135), 0,4% de albúmina bovina sérica (BSA) fracción V (Sigma-Aldrich A3311), 0,015 mg/mL de penicilina sódica (Sigma-Aldrich P3032) y 0,025 mg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich S1277).

- **Maduración *in vitro* de ovocitos**

  Para la maduración *in vitro* se utilizó el medio TCM 199 con sales Earle (Sigma-Aldrich M5017) suplementado con bicarbonato de sodio, gentamicina. Se adicionó melatonina a tres diferentes concentraciones: 10^{-7}, 10^{-9} y 10^{-11} M.

- **Evaluación de ROS**

  Para evaluar la actividad intracelular de ROS post maduración de ovocitos, se empleó una técnica de tinción con fluorescencia utilizando la sonda 2',7'-diclorofluoresceína 3',6'-diacetato (DCFDA) donde el nivel de fluorescencia va a estar directamente relacionado con la cantidad de ROS intracelular.

- **Activación química**

  Este proceso consistió en incubar por 5 minutos los ovocitos maduros en Medio 199 con Hepes (Sigma-Aldrich, M2520) suplementado con 2,2 g/L de bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich, S5761), 0,4% de albúmina bovina sérica fracción V (Sigma-Aldrich, A3311) y 5 µM de ionomicina de calcio (Sigma- 32 Aldrich, I0634). Posteriormente, los ovocitos se incubaron por 5 horas en aaKSOM (Merck, cat. MR-106-D), el cual se suplementó con 0,4% de albúmina bovina sérica libre de ácidos grasos (SigmaAldrich, A7030), 50 µg/mL de

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

gentamicina (Sigma-Aldrich, G1264), 2 mM de piruvato de sodio (Sigma-Aldrich, P5280) y 2 mM de 6 - dimetilaminopurina (6-DMAP) (Sigma-Aldrich, D2629).

- **Cultivo de embriones**

Una vez activados los ovocitos o luego de 24 horas en el medio de fecundación se dejaron cultivando los presuntos embriones en aaKSOM (Merck, cat. No. MR-106-D) suplementado con 0,4% de albúmina bovina sérica libre de ácidos grasos (SigmaAldrich, cat. No. A7030), 50 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich, cat. No. G1264) y 2 mM de piruvato de sodio (Sigma-Aldrich, cat. No. P5280) a condiciones de trigas (5% O_2, 5% CO_2 y 90% N_2).

4.1.3 Equipos y materiales de laboratorio

Los equipos de laboratorio utilizados incluyeron: refrigeradora, balanza analítica (Sartorius), medidor de pH (Hanna Instruments), estereoscopio, autoclave, estufa (Telco), plancha térmica (Minitube-HT50), cámara de flujo laminar (Biobase) microscopio invertido (Accu-Scope), incubadora de CO_2 (Thermo Scientific – Forma Series II), y micropipetas (Eppendorf).

En cuanto a los materiales necesarios para el trabajo se incluyeron: puntas para micropipeta (10, 200 y 1000 µL), pipetas Pasteur de vidrio, bulbos de goma para pipetas, pipetas Pasteur de vidrio, bulbos de goma para pipetas, pipetas Pasteur de plástico, jeringas (10 y 20 mL), agujas 20G, hojas de bisturí, tubos de centrífuga (1,5; 0,5 y 0,2 mL), tubos Falcon (15 y 50 mL), frascos de urocultivo, placas Petri de plástico y de vidrio, placas de 4 pozos Falcon, pinzas gruesas, tijeras de metal, rejillas metálicas, vasos de precipitados, gel-packs, caja termoaislante y filtros de membrana de 0,22 µm.

Además, se utilizaron materiales de bioseguridad personal, como guantes de nitrilo, mascarillas y gorro.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

4.2 Métodos

4.2.1 Colecta de ovarios y ejecución del estudio

Los ovarios de alpaca fueron colectados en el camal municipal de Huancavelica y, posteriormente, transportados en termos incluyendo una caja aislante a una temperatura de 25 °C hasta el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM para su procesamiento luego de veintidós horas *post mortem* (Figura 3).

4.2.2 Obtención de ovocitos

Los ovocitos fueron extraídos mediante aspiración de los folículos que presenten un diámetro comprendido entre 3 y 6 mm directamente de la superficie de los ovarios, empleando jeringas y agujas de 20G (Chuquitaype et al., 2015) (Figura 4 y Figura 5).

4.2.3 Selección de ovocitos

Los ovocitos obtenidos mediante el método de aspiración folicular fueron observados a través de un estereoscopio, donde se realizó una selección en función de las características morfológicas, de acuerdo con lo descrito por Ratto et al., 2005. Bajo este criterio, se seleccionaron los ovocitos de características 1 y 2, donde los primeros presentan un citoplasma homogéneo y al menos 5 capas de células del cúmulo, mientras que los segundos presentaban también un citoplasma homogéneo y de 2 a 4 capas de células del cúmulo (Figura 7).

4.2.4 Maduración de ovocitos

Para la maduración *in vitro* se utilizó, por ser el más empleado y que ha dado mejores resultados, el medio TCM 199 con bicarbonato de sodio como estabilizante del pH (Chuquitaype et al., 2015; Torres et al., 2017; Castro et al., 2022).

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

El medio fue suplementado con gentamicina, antibiótico para evitar potenciales agentes contaminantes captados en los camales. Del mismo modo, se adicionaron fuentes proteicas como albúmina sérica bovina (BSA) y suero fetal bovino (SBF), que sirvieron como fuentes de nitrógeno, así como agentes quelantes de iones antioxidantes y tóxicos que se pudieran encontrar en el medio (Jee, et al., 2008). Se agregó melatonina sintética (Merck M5250) como agente antioxidante y promotor de la maduración (Yue Li et al., 2019) en tres diferentes concentraciones: 10^{-7}, 10^{-9} y 10^{-11} M.

Cada uno de estos tratamientos fue dispensado en cantidades de 350 µL en los pozos de las placas de 4 pozos correctamente rotulados y almacenados en la incubadora *overnight* a 37 °C, 5% de CO_2 y 100% de humedad relativa (Figura 4).

Posteriormente, los ovocitos seleccionados fueron distribuidos de manera homogénea en los diferentes tratamientos para su incubación por un periodo de 32 horas.

4.2.5 Evaluación de la maduración de ovocitos

Una vez transcurrido el periodo de maduración *in vitro*, las células del cúmulo adheridas fueron desprendidas con ayuda de suaves pipeteos en una gota de 100 uL de hialuronidasa por 1 minuto y posteriormente lavados en Medio 199 con Hepes a 37 °C. Luego los ovocitos se observaron a través de un microscopio invertido y se consideraron como maduros los que presentaron un cuerpo polar o polocito en el espacio perivitelino.

4.2.6 Evaluación de ROS

Para evaluar la actividad intracelular de ROS post maduración de ovocitos, se empleó la técnica de tinción con fluorescencia utilizando el indicador 2',7'-diclorofluoresceína 3',6'-diacetato (DCFDA) durante 1 hora en oscuridad.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

Posteriormente, se lavaron los ovocitos en Medio 199 con Hepes y se observaron en fluorescencia en gotas de 50 µL.

4.2.7 Evaluación de competencias de los ovocitos maduros

Con el propósito de evaluar la competencia de los ovocitos maduros, se empleó la activación química con ayuda de un ionóforo de calcio conocido como ionomicina por 5 minutos el cual va a inducir oscilaciones de calcio en los ovocitos madurados *in vitro*, lo que permite inactivar el factor promotor de maduración y la proteína quinasa activada por mitógeno, permitiendo completar la meiosis y la formación de los pronúcleos (Vallejo et al., 2003). Así mismo, se ayudó este proceso con una posterior incubación por 5 horas con el 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), cuya función es la de ser un agente inhibitorio del promotor de la maduración. Posteriormente, fueron cultivados en el medio de desarrollo aaKSOM por un periodo de 7 días, luego de los cuales se evaluó la formación de embriones.

4.2.8 Cultivo de embriones

Luego de realizar la activación química, se procedió a lavar los ovocitos en el medio de cultivo (aaKSOM) y se colocaron, de manera equitativa, en las placas con el mismo medio previamente preparadas. El cultivo se realizó durante 7 días en una incubadora a condiciones de 37.0 °C, trigas (5% de CO_2, 5% de O_2 y balance de N_2) y 100% de humedad relativa.

4.2.9 Valoración del desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario fue evaluado en el día 4 y el día 7 de cultivo, observando y catalogando el estadio de desarrollo embrionario presente en cada tratamiento de acuerdo a los criterios de ASEBIR (Figura 7). De acuerdo a sus características morfológicas, estos se clasificaron en embriones de 2 células, mórulas, blastocisto u ovocitos sin desarrollo.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

4.2.10 Análisis estadístico

Todos los datos se reportaron como la media – desviación estándar. La normalidad se determinó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Todos los análisis estadísticos de los datos se realizaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguidos de la prueba post hoc de Tukey.$p \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

5 RESULTADOS

5.1 Ovocitos aislados

En el presente estudio, se lograron aislar un total de 791 ovocitos morfológicamente de clase I y II, los que se consideraron para la maduración *in vitro* (según Torres, 2017), los cuales provinieron de 293 ovarios distribuidos en siete fechas o repeticiones tal como se muestra en la Tabla 1 y Tabla 3)

Tabla 1. Promedio de ovocitos aislados por ovario

Nº de ovarios (n)	N° de ovocitos de clases I y II aislados por ensayo ($\bar{x} \pm s$)	N° de ovocitos de clases I y II aislados por ovario ($\bar{x} \pm s$)
293	123,0 ± 43,6	2,9 ± 0,6

5.2 Efecto de la suplementación del medio de maduración con melatonina sobre la tasa de maduración *in vitro*

Para la maduración *in vitro* se utilizó, por ser el más empleado y que ha dado mejores resultados, el medio TCM 199 con adición de bicarbonato de sodio como estabilizante del pH.

El medio se suplementó con melatonina como agente antioxidante y promotor de la maduración en tres diferentes concentraciones: 10^{-7}, 10^{-9} y 10^{-11} M.

Luego del tiempo de incubación, por 32 horas, de MIV, no se observó diferencia significativa entre los tratados con melatonina y el control, ni en la tasa de maduración ni en activación embrionaria inducida químicamente. En el caso de la tasa de blastulación, se observó diferencia significativa entre los tratamientos Control y 10^{-7} M, así como 10^{-7} M y 10^{-11} M (Tabla 2 y Tabla 10).

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

Tabla 2. Tasas de desarrollo embrionario en diferentes estadios

Tratamiento Concentración de melatonina en medio	Tasa de maduración n° de ovocitos maduros/Total de ovocitos aislados (%) ± DE	Tasa de activación n° de embriones/Total de ovocitos maduros (%) ± DE	Tasa de blastulación n° de blastocistos/Total de ovocitos maduros (%) ± DE
Control negativo	**153/226 (66.4 ± 10.7)**	**73/136 (55.8 ± 11.8)**	**18/77 (23.4 ± 3.7)[a, b]**
10^{-7} M	**143/215 (66.1 ± 13.1)**	**70/115 (59.8 ± 18.1)**	**26/62 (41.9 ± 4.3)[c]**
10^{-9} M	**150/214 (67.2 ± 17.0)**	**79/132 (59.0 ± 20.8)**	**28/79 (35.4 ± 8.3)[b, c]**
10^{-11} M	**131/206 (62.1 ± 14.0)**	**58/127 (42.7 ± 12.1)**	**18/66 (27.3 ± 6.4)[a, b]**

Los exponentes diferentes [a,b, c] indican diferencias estadísticamente significativas.

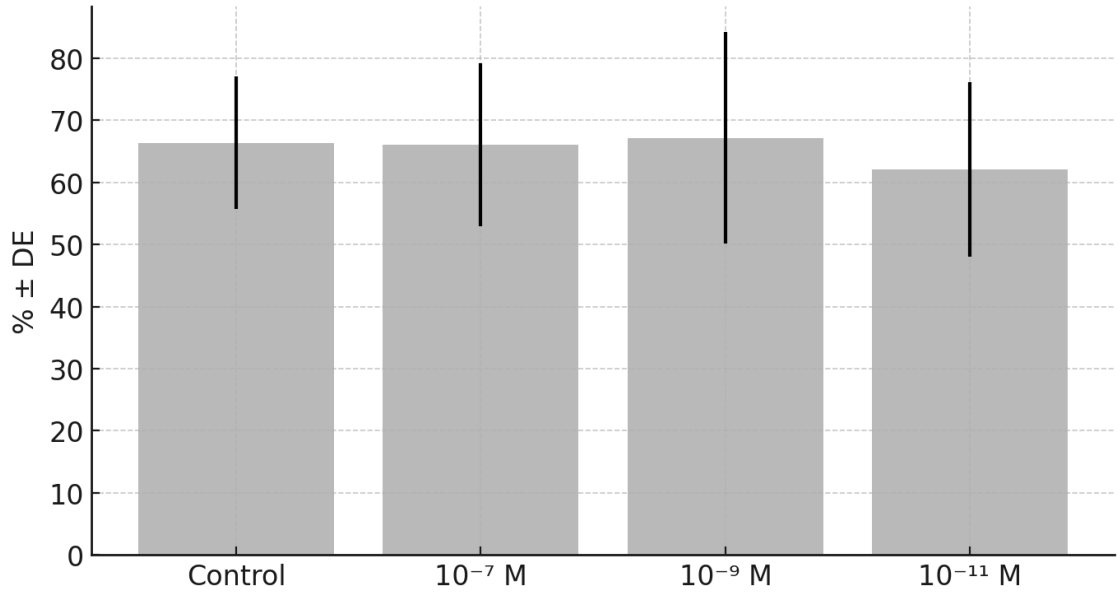


Gráfico 1. Tasas de maduración ovocitaria en diferentes concentraciones de melatonina.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

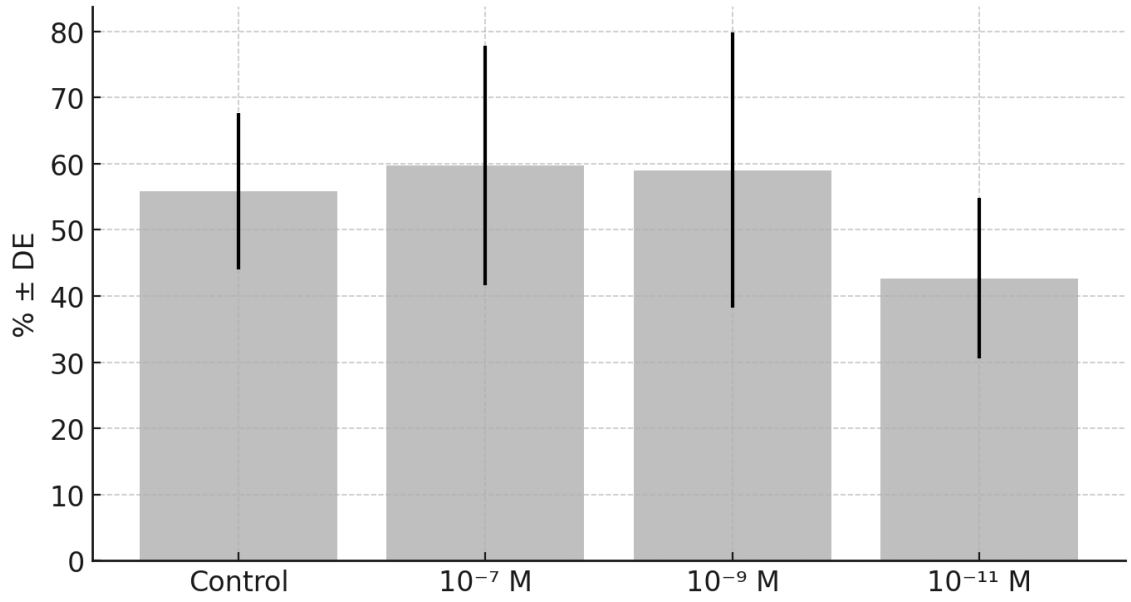


Gráfico 2. Tasas de activación ovocitaria en diferentes concentraciones de melatonina

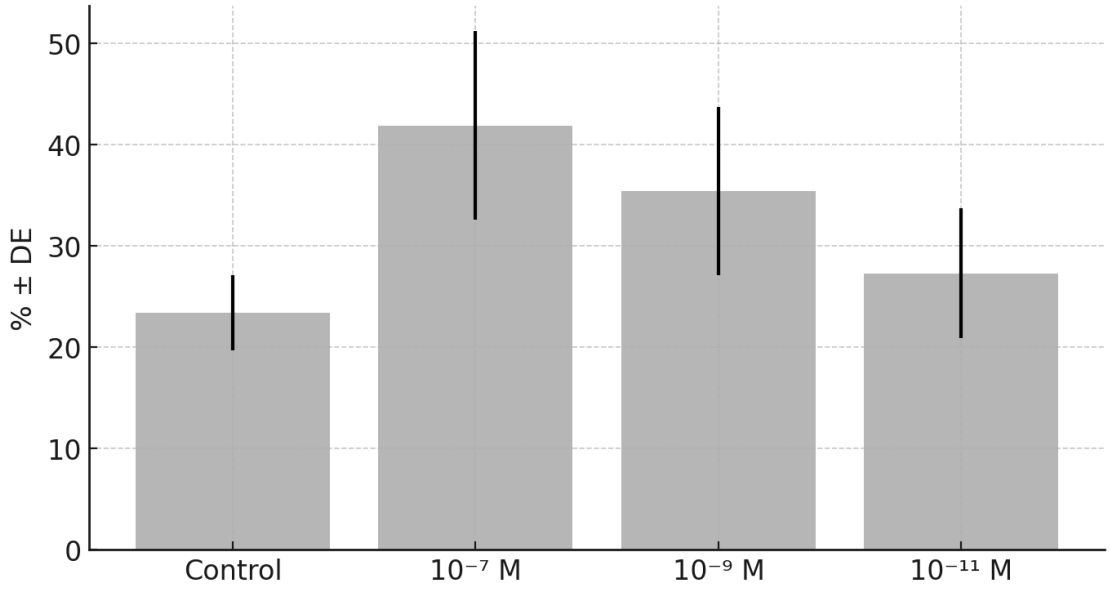


Gráfico 3. Tasas de blastulación en diferentes concentraciones de melatonina.

5.3 Efecto de la suplementación del medio de maduración con melatonina sobre el ROS en ovocitos post maduración *in vitro*

Se evaluaron un total de 131 ovocitos distribuidos en tres fechas (Tabla 7). No se encontraron diferencias entre tratamientos en cuanto a la intensidad de

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

fluorescencia, la cual fue baja, lo que sugiere también un bajo nivel de ROS intracelular hallado en cada ovocito (Figura 1).

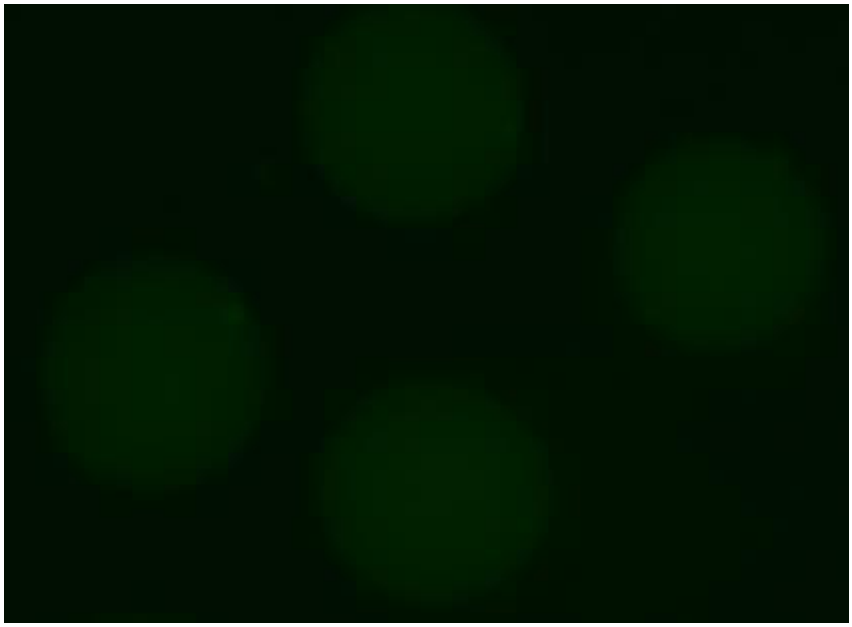


Figura 2. Ovocitos post maduración in vitro en fluorescencia con indicador DCFDA (200X).

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

6 DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se utilizó la hormona melatonina como agente antioxidante, en diferentes concentraciones, en el medio de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca. La adición de melatonina ha sido reportada como beneficiosa en la maduración y desarrollo embrionario *in vitro* en diversas especies, como bovinos (Reiter et al., 2009; Wang et al., 2014), porcinos (Shi et al., 2009) y ovinos (Kang et al., 2009), debido a su capacidad para reducir el estrés oxidativo y mejorar la calidad ovocitaria. Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios publicados sobre su uso en ovocitos de alpaca, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo constituyen una base preliminar para evaluar el efecto de antioxidantes como la melatonina en los medios de cultivo de gametos femeninos en esta especie.

A pesar de estas limitaciones, la aspiración de ovocitos provenientes de ovarios de camales representa una herramienta invaluable para la investigación en camélidos sudamericanos, al reducir la necesidad de intervenir en animales vivos y ampliar la disponibilidad de material biológico. Esta técnica facilita el estudio de los factores que afectan la maduración y la fecundación de los ovocitos en alpacas y podría ser utilizada en combinación con métodos de maduración *in vitro* y con tecnologías de criopreservación para conservar el material genético de alpacas en riesgo o para programas de mejora genética (Silva et al., 2019).

La selección y clasificación adecuada de los ovocitos es fundamental para mejorar los resultados en la producción de embriones *in vitro*, especialmente en especies con particularidades reproductivas como las alpacas. Diversos estudios en bovinos, ovinos y camélidos sudamericanos han demostrado que la morfología ovocitaria está relacionada con el potencial de desarrollo embrionario (Lonergan et al., 2003; Del Campo et al., 2002; Huanca et al., 2019). Esta

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

práctica permite maximizar el uso de ovocitos de alta calidad y optimizar los recursos disponibles, facilitando el avance de las biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos.

La melatonina tiene efectos positivos en los ovocitos al actuar como un antioxidante natural que protege del estrés oxidativo, mejora su calidad y favorece su progresión hacia la madurez meiótica y citoplasmática, principalmente mediante la regulación de la expresión y actividad de enzimas antioxidantes intracelulares como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPx). Estas enzimas desempeñan un papel clave en la neutralización de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la maduración ovocitaria. Estudios en bovinos y porcinos han demostrado que la suplementación con melatonina durante la maduración *in vitro* incrementa los niveles de estas enzimas, mejora la tasa de maduración y la calidad de los embriones resultantes (Wang et al., 2014; Shi et al., 2009). Este efecto indirecto refuerza la capacidad del ovocito para lidiar con el estrés oxidativo durante la MIV, lo cual resulta especialmente relevante en especies sensibles como los camélidos sudamericanos (Silva et al., 2020).

A pesar de ello, en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en las tasas de MIV y activación entre los tratamientos. Al realizar el análisis con fluorescencia, se observa que tampoco hay diferencias en las intensidades entre los tratamientos post MIV; sin embargo, se evidenció una mayor tasa de llegada a blastocisto, desde el estadio inicial hasta *hatched*, en el cultivo con melatonina a 10^{-7} M, la cual no presentó diferencia significativa con el cultivo a 10^{-9} M. Esto es congruente con los resultados obtenidos por An et al. (2019), quienes observaron que los cultivos suplementados con melatonina a esas concentraciones mejoraron las tasas de desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto. Este efecto fue atribuido a la capacidad de la melatonina

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

para reducir el estrés oxidativo, proteger la función mitocondrial, prevenir la apoptosis, favorecer la maduración nuclear y promover un perfil epigenético más adecuado para el desarrollo temprano del embrión. En este punto, se puede observar que el efecto que tiene este antioxidante se ve reflejado durante el desarrollo embrionario, al propiciar que un mayor número de embriones lleguen a un estadio posterior como el de blastocisto. En ese sentido, los ovocitos, durante la fase de MIV, se encontrarían protegidos del daño al estrés oxidativo debido a las moléculas de SOD y GSH inherentes que desempeñan funciones clave en la protección contra el estrés oxidativo y en la regulación de procesos celulares esenciales para la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario (Rodríguez et al., 2020).

La inclusión de melatonina en el medio de maduración permite elevar los niveles de SOD y GSH (He et al., 2018). En consecuencia, los ovocitos podrían almacenar estas moléculas a nivel intracelular a manera de reserva, lo que protegería de daños oxidativos al embrión hasta el estadio de blastocisto (Quintanilla et al., 2015). Del mismo modo, la melatonina cumpliría una función de prevención de defectos de comunicación con las células del cúmulo asociados con la edad, ayudando al relevo de moléculas metabólicas antioxidantes para el mantenimiento de la calidad de los ovocitos con las células del cúmulo, lo cual tiene una relevancia importante para el tratamiento de la infertilidad y el envejecimiento celular (Zhang et al., 2022).

La melatonina también juega un rol importante en la activación partenogenética de ovocitos, favoreciendo la reanudación de la meiosis y el inicio de las divisiones celulares. Al reducir los niveles de estrés oxidativo, se mejora la capacidad del ovocito activado para avanzar en el desarrollo temprano, lo que resulta en una mayor eficiencia en la obtención de blastocistos (Ratto et al., 2020).

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

Al suplementar melatonina 10^{-9} M, se observó que los niveles de ROS se encontraban disminuidos en los ovocitos y las células de la granulosa, lo que indicaba una reducción del estrés oxidativo y un aumento de los niveles de glutatión intracelular en los ovocitos. La atenuación del estrés del retículo endoplasmático (RE) se detectó en el grupo tratado con melatonina mediante el análisis de la expresión génica de los genes asociados al estrés del RE mediante qRT-PCR. La melatonina disminuye el estrés oxidativo en los complejos cúmulo-ovocito durante MIV, lo que podría atenuar el estrés del RE en los ovocitos y mejorar su calidad, favoreciendo así la eficiencia de las tecnologías de reproducción asistida. (Islam et al., 2025).

La melatonina influye también en la expresión de genes clave asociados con el desarrollo embrionario, como aquellos relacionados con la apoptosis y el estrés celular. Su capacidad para regular estos procesos contribuye a reducir la muerte celular programada y a aumentar la tasa de embriones viables (Valverde et al., 2020).

A pesar de estos resultados alentadores, es necesario seguir investigando para determinar otras concentraciones de melatonina y las condiciones específicas de cultivo que maximicen sus efectos beneficiosos en los ovocitos de alpaca. Además, aunque los avances en la investigación básica son prometedores, la implementación de estas técnicas en granjas comerciales de alpacas enfrenta desafíos en términos de infraestructura y capacitación (Huanca et al., 2021). Sin embargo, la incorporación de antioxidantes como la melatonina podría representar una herramienta clave para mejorar la eficiencia de las biotecnologías reproductivas en alpacas, incrementando las tasas de éxito en la obtención de embriones de mejor calidad y, con ello, optimizando la productividad reproductiva de esta especie.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

7 CONCLUSIONES

- La melatonina actúa como un antioxidante multifuncional, protegiendo al ovocito del estrés oxidativo y promoviendo la obtención de un mayor número de embriones en estadio de blastocisto, particularmente a una concentración de 10^{-7} M.
- Los ensayos realizados demuestran que el cultivo de MIV con melatonina a 10^{-7} M incrementó la tasa de blastulación a 41.9 %, en comparación con el 23.4 % obtenido en el cultivo convencional, lo que representa una mejora en la producción de blastocistos bajo las condiciones evaluadas.
- La concentración de melatonina es un factor crítico: dosis menores (10^{-9} M y 10^{-11} M) no mostraron un incremento significativo en la tasa de blastulación, lo que indica que el efecto beneficioso es dependiente de la dosis.
- Estos resultados respaldan el potencial uso de la melatonina como un suplemento en protocolos de maduración *in vitro* en camélidos sudamericanos, lo que podría contribuir a optimizar las tasas de éxito en biotecnologías reproductivas aplicadas a esta especie.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

8 RECOMENDACIONES

- Se recomienda el estudio de concentraciones adicionales de melatonina, de modo que promueva una mayor tasa de embriones en blastocisto de las encontradas en este estudio.
- Se sugiere la evaluación comparada de otros antioxidantes que pudieran tener efectos similares a la melatonina con la intención de contrastarlo con los resultados de este estudio.
- Se propone el uso de una incubadora tipo *benchtop* que permita mantener un mejor control de las condiciones de cultivo, así como una menor alteración al momento de manipular las placas.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASEBIR – Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción. (2015). Cuadernos de embriología clínica (3ª ed.): Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Madrid: ASEBIR.
- An, Q., Peng, W., Cheng, Y., Lu, Z., Zhou, C., Zhang, Y., & Su, J. (2019). Melatonin supplementation during *in vitro* maturation of oocyte enhances subsequent development of bovine cloned embryos. *Journal of cellular physiology*, *234*(10), 17370–17381. https://doi.org/10.1002/jcp.28357
- Bravo, P. W., Flores, D., & Ordoñez, C. (2013). Fisiología reproductiva de la alpaca: Aspectos claves. Revista de Ciencias Veterinarias Andinas, 8(2), 56-65.
- Bravo, P. W., Flores, D., & Ratto, M. H. (2020). Hormonal regulation and follicular dynamics in alpacas. Theriogenology, 151, 29-38.
- Cárdenas, M., Valdivia, J., & Gómez, P. (2018). Desarrollo embrionario *in vitro* en camélidos sudamericanos: Limitaciones y avances. Revista de Biotecnología Reproductiva Andina, 5(2), 78-89.
- Castro-Modesto, T., Mamani, P., Pella, R., Bravo, Z., Villarreal-Ugarte, S., Cancho, C., Aguila, L., Ratto, M. H., & Valdivia, M. (2022). Effect of follicle size on *in vitro* maturation in alpaca oocytes (Vicugna pacos)and the first ICSI in alpaca species. Small Ruminant Research, 106680. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2022.106680
- Combelles, Catherine M. H., et al. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. International Journal of Developmental Biology, 2013, vol. 56, no 10-11-12, p. 819-831.
- Chuquitaype, M., & Erón, R. (2015). Adaptación de un protocolofertilización *in vitro* pæa alpacas (Vicugna pacos) y su evaluación a 4200 msnm en el

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

departamento de Puno.Tesis para optar por el título de Ingeniero Biotecnólogo. Universidad Católica de Santa María.

- Del Campo, M. R., Del Campo, C. H., Donoso, X., & Barros, C. (2002). Morphologic characteristics and meiotic competence of alpaca (Lama pacos) oocytes. *Animal Reproduction Science*, 72(1-2), 37–46. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(02)00071-3
- Flores, C., & Mamani, M. (2021). Conservación y manejo sostenible de alpacas en el contexto del cambio climático. Revista Andina de Desarrollo Sostenible, 7(3), 45-60.
- Flores, C., & Valdivia, J. (2017). *La alpaca en los Andes peruanos: Un recurso estratégico*. Revista Andina de Investigación Agrícola, 5(3), 45-57.
- Flores, C., Valdivia, J., & Mamani, M. (2020). Estrategias de mejoramiento genético para alpacas en Perú. *Revista de Ciencia Animal Andina*, 10(2), 123-136.
- García, L., Huanca, T., & Mamani, R. (2019). Eficiencia de la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca: Factores que afectan el rendimiento. Ciencia Animal del Altiplano, 7(1), 135-142.
- Gougeon, A. (2018). *Ovogenesis and follicular development: the resumption of meiosis and formation of the secondary oocyte and polar body.* En *Oogenesis* [Video]. JoVE Core: Anatomy and Physiology.
- González, M., & Valverde, A. (2017). Fertilización *in vitro* y sus limitaciones en la reproducción de alpacas. Revista Andina de Ciencia Reproductiva, 9(4), 201-213.
- González, M., Valverde, A., & Quispe, F. (2019). Factores que afectan la mortalidad embrionaria temprana en alpacas. Ciencia Animal Andina, 8(3), 123-136.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

- González, M., Valverde, A., & Quispe, F. (2020). Distribución y conservación de camélidos sudamericanos: Enfoque en la alpaca. Ciencia Animal Andina, 9(2), 97-110.
- He, R., Cui, M., Lin, H., Zhao, L., Wang, J., Chen, S., & Shao, Z. (2018). Melatonin resists oxidative stress-induced apoptosis in nucleus pulposus cells. *Life Sciences*, *199*, 122–130. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.03.020
- Huanca, T. (2020). Impacto del ambiente en la fertilidad de machos alpaca. Revista Andina de Ciencia Animal, 10(2), 78-91.
- Huanca, T., Valverde, A., & Gómez, L. (2019). Avances en biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos. Veterinaria Andina, 7(1), 45-62.
- Huanca, T., Valverde, A., & González, M. (2021a). Factors influencing follicular development and ovulation in alpacas. Reproductive Biology and Endocrinology, 19(1), 52.
- Huanca, T., Valverde, A., & González, M. (2021b). Optimization of chemical activation protocols for alpaca oocytes and early embryo development. *Journal of Camelid Science*, 15(2), 15-27.
- Huanca, T., Valverde, A., & González, M. (2021c). Reactive oxygen species in alpaca oocytes: Fluorescent analysis and impact on embryo development. Journal of Camelid Science, 15(2), 45-57.
- Huanca, W., Valdivia, M., & Apaza, R. (2019). Evaluación morfológica de ovocitos y tasas de maduración *in vitro* en alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(2), 473–481.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). (2020). Censo agropecuario de camélidos sudamericanos. Lima: INEI.
- Islam, M. N., Ebara, F., Konno, T., Tatemoto, H., & Yamanaka, K. I. (2025). Melatonin improves the *in vitro* growth of bovine oocytes collected from early antral follicles by maintaining oocyte-cumulus cell communicationReproductive medicine and biology, 24(1), E12629. https://doi.org/10.1002/rmb2.12629

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

- Kadwell, M., Fernández, M., Stanley, H., Baldi, R., Wheeler, J. C., Rosadio, R., & Bruford, M. W. (2001). Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 268(1485), 2575-2584.
- Kang, J. T., Koo, O. J., Kwon, D. K., Park, H. J., Jang, G., Kang, S. K., & Lee, B. C. (2009). Effect of melatonin on *in vitro* development and intracellular melatonin level of porcine parthenogenetic embryos. *Zygote*, 17(3), 229–235. https://doi.org/10.1017/S0967199409005281
- Lonergan, P., Fair, T., Corcoran, D., & Evans, A. C. O. (2003). Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, 59(1), 51–60. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01246-9
- Mamani, M. (2019). Problemática reproductiva en alpacas: Diagnóstico y perspectivas. Veterinaria Andina, 6(1), 89-101.
- Mendoza, A., Gómez, P., & Quispe, F. (2018). Impacto económico de la fibra de alpaca en las comunidades altoandinas de Perú. Economía Rural Andina, 12(4), 150-163.
- Quintanilla M., L., Huanca L., W., Córdova G., A., Ampuero B., A., & Benavides I., L. (2015). Efecto de la Suplementación del Medio de Maduración con Cisteamina y de Dos Medios de Cultivo (KSOMaa y SOF) en la Fecundación *in vitro* de Ovocitos Bovinos. Revista de investigaciones veterinarias del Peru, 26(3), 462. https://doi.org/10.15381/rivep.v26i3.11178
- Quispe, E., Mamani, M., & Valdivia, J. (2018). Influencia del manejo nutricional en la dinámica folicular de alpacas criadas en los Andes peruanos. Revista Andina de Ciencia Animal, 7(2), 98-112.
- Quispe, E., Valdivia, J., & Gómez, P. (2017). Taxonomía y manejo de razas de alpacas en los Andes peruanos. Veterinaria Andina, 6(3), 123-136.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

- Quispe, F., & Gómez, P. (2021). Capacitación técnica y manejo de alpacas en el Altiplano peruano. Revista de Desarrollo Rural, 8(3), 67-82.
- Ratto, M., Berland, M., Huanca, W., Singh, J., & Adams, G. P. *In vitro* and in vivo maturation of llama oocytes. Theriogenology, 2005, vol. 63, no 9, p. 2445-2457.
- Ratto, M. H., Valderrama, X., & Silva, M. (2019). Folliculogenesis and ovulatory mechanisms in alpacas: A comprehensive review. Reproduction in Domestic Animals, 54(4), 630-638.
- Ratto, M. H., Silva, M., & Valderrama, X. (2021). Ovulation-inducing factor in semen: Mechanisms and implications for reproductive efficiency in alpacas. Frontiers in Veterinary Science, 8, 645671.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., & Fuentes-Broto, L. (2009). Melatonin: A multitasking molecule. *Progress in Brain Research*, 181, 127–151. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)81008-4
- Rivera, M., Mamani, M., & Quispe, F. (2018). Duración de la gestación y parto en alpacas: Estudio comparativo. Revista de Reproducción Animal Andina, 6(4), 50-61.
- Rodríguez, C., Pérez, J., & García, A. (2020). Effects of glutathione supplementation on *in vitro* maturation of alpaca oocytes. *Animal Reproduction Science, 215*, 106350.
- Sharma, S., & Teklehaimanot, S. (2020). The role of FSH and LH in the process of oogenesis. Endocrine Research, 44(2), 89-102.
- Shi, J. M., Tian, X. Z., Zhou, G. B., Wang, L., Gao, C., Zhu, S. E., & Liu, G. S. (2009). Melatonin enhances the *in vitro* development of porcine preimplantation embryos by preventing apoptosis. *Journal of Pineal Research*, 47(4), 336–342. https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00713.x
- Silva, J. V., Castillo, A., & Huanca, W. (2020). Efecto de la melatonina sobre la maduración ovocitaria *in vitro*: una revisión. *Revista Peruana de Reproducción Animal*, 36(1), 12–20.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

- Silva, M., Valdivia, J., & González, C. (2014). El factor ovulatorio en el semen de camélidos sudamericanos: Mecanismos y aplicación. Veterinaria Andina, 5(1), 45-58. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.01.038
- Silva, M., Ratto, M. H., & Valderrama, X. (2019). Ovulation-inducing factor (OIF) in semen: Biological function and reproductive significance in South American camelids. Theriogenology, 140, 23-31.
- Silva, M., Ratto, M. H., & Valderrama, X. (2020). Fluorescence-based quantification of ROS in alpaca oocytes using DCFDA: Implications for *in vitro* maturation. Theriogenology, 155, 40-50.
- Skinner, M. K. (2021). Follicular development and atresia: Mechanisms and clinical implications. *Journal of Ovarian Biology*, 5(1), 45-62.
- Turathum, B., Gao, E.-M., & Chian, R.-C. (2021). The Function of Cumulus Cells in Oocyte Growth and Maturation and in Subsequent Ovulation and Fertilization. Cells, 10(9), 2292. https://doi.org/10.3390/cells10092292
- Wang, F., Tian, X., Zhang, L., He, C., Ji, P., Li, Y., & Duan, Y. (2014). Beneficial effects of melatonin on *in vitro* bovine embryo development are mediated by melatonin receptors. *Reproduction*, 148(6), 489–500. https://doi.org/10.1530/REP-14-0176
- Wiedner, E. (2021). *Reproduction of Llamas and Alpacas*. *MSD Veterinary Manual*
- Wheeler, J. C. (2019). Origen y domesticación de los camélidos sudamericanos. Revista de Arqueología Andina, 15(2), 45-59.
- Zambrano, R., & Mamani, M. (2020). Melatonina y estrés oxidativo en la maduración oocitaria *in vitro* en alpacas. Ciencia Animal del Altiplano, 8(2), 123-135.
- Zhang, H., Li, C., Wen, D., Li, R., Lu, S., Xu, R., Tang, Y., Sun, Y., Zhao, X., Pan, M., & Ma, B. (2022). Melatonin improves the quality of maternally aged oocytes

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

by maintaining intercellular communication and antioxidant metabolite supply. Redox biology, 49, 102215. https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102215

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

10 ANEXOS



Figura 3. Envase de traslado de la muestra biológica

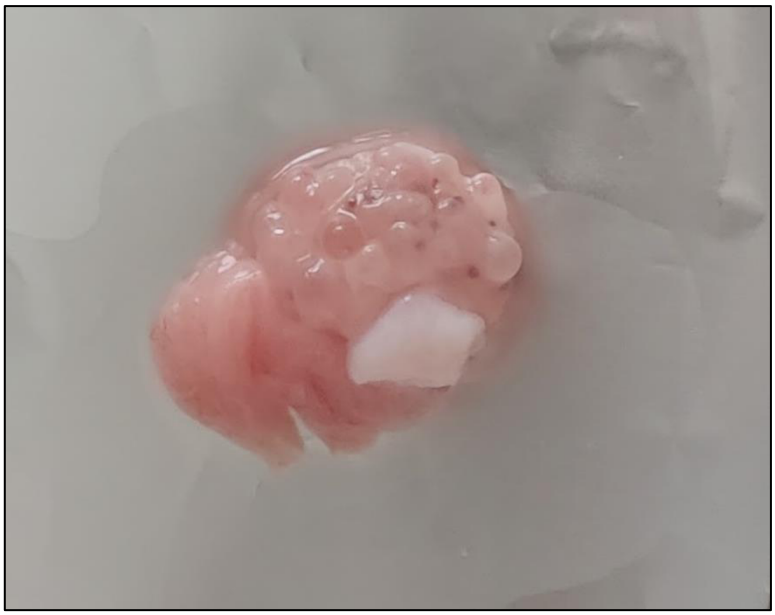


Figura 4. Ovario de alpaca 5X

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26



Figura 5. Obtención de ovocitos por método de aspiración folicular



Figura 6. Medios en placa de cultivo

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

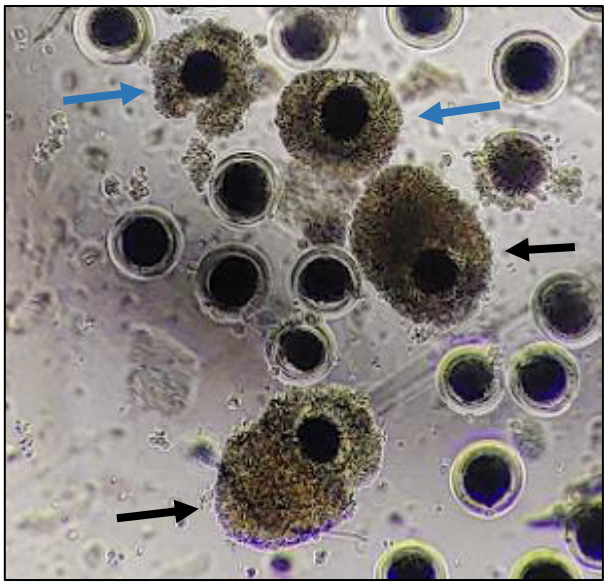


Figura 7. Ovocitos obtenidos por aspiración y seleccionados para maduración in vitro:

Clase 1 (flecha negra) y clase 2 (flecha azul). 20X

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

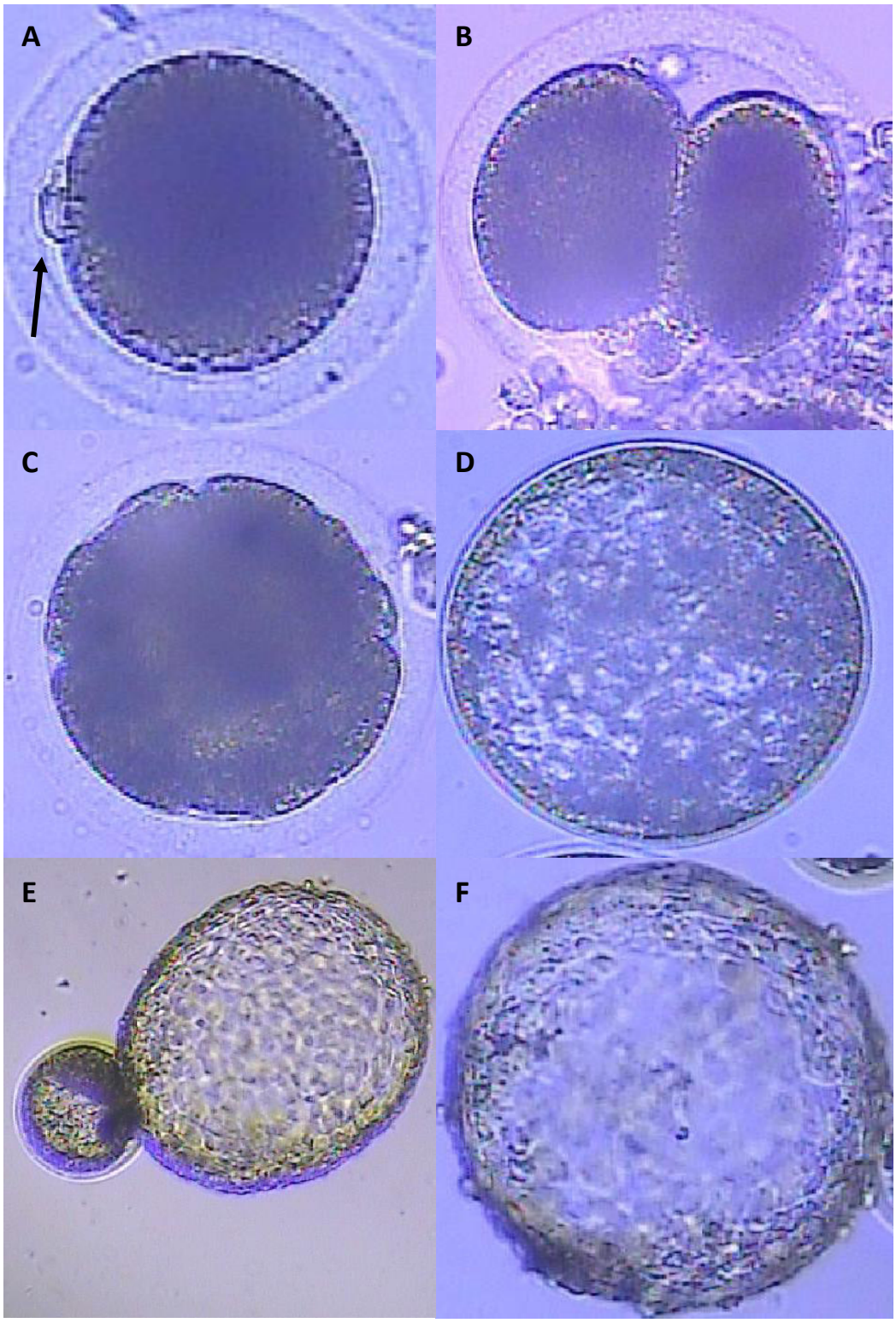


Figura 8. Desarrollo embrionario. A. Ovocito maduro con presencia de cuerpo polar (flecha negra). B. Embrión de 2 células. C. Embrión en estadio de mórula. D. Embrión en estadio de blastocisto. E. Embrión en hatching. F. Embrión hatched o eclosionado. Aumento 200X.

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

Tabla 3. Número de ovarios y ovocitos de categoría 1 y 2 recuperados por fecha

Fecha de procesamiento	# Ovarios	# Ovocitos recuperados	# Ovocitos recuperados por ovario
7/03/2023	40	118	2.95
8/03/2023	35	71	2.03
21/03/2023	50	178	3.56
22/03/2023	37	99	2.68
28/03/2023	40	96	2.40
29/03/2023	50	188	3.76
18/04/2023	41	111	2.71
Promedio	41.86 ± 5.9	123 ± 43.64	2.87 ± 0.61

Tabla 4. Número de ovocitos maduros obtenidos tasa de maduración por tratamiento y fecha

Fecha de procesamiento	Tratamiento	# Ovocitos maduros/total	Tasa de maduración
7/03/2023	Control	18/31	58.06%
	10^{-7} M	15/31	48.39%
	10^{-9} M	19/31	61.29%
	10^{-11} M	15/25	60.00%
8/03/2023	Control	11/18	61.11%
	10^{-7} M	11/18	61.11%
	10^{-9} M	7/17	41.18%
	10^{-11} M	11/18	61.11%
21/03/2023	Control	39/51	76.47%
	10^{-7} M	26/41	63.41%

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

	10^{-9} M	40/45	88.89%
	10^{-11} M	34/41	82.93%
22/03/2023	Control	17/25	68.00%
	10^{-7} M	17/24	70.83%
	10^{-9} M	16/24	66.67%
	10^{-11} M	10/26	38.46%
28/03/2023	Control	20/25	80.00%
	10^{-7} M	21/24	87.50%
	10^{-9} M	21/24	87.50%
	10^{-11} M	17/23	73.91%
29/03/2023	Control	33/46	71.74%
	10^{-7} M	38/50	76.00%
	10^{-9} M	32/46	69.57%
	10^{-11} M	29/46	63.04%
18/04/2023	Control	15/30	50.00%
	10^{-7} M	15/27	55.56%
	10^{-9} M	15/27	55.56%
	10^{-11} M	15/27	55.56%

Tabla 5. Número de embriones obtenidos y tasa de activación de ovocitos por tratamiento y fecha

Fecha de procesamiento	Tratamiento	# embriones/ovocitos maduros	Tasa de activación
7/03/2023	Control	11/18	61.11%
	10^{-7} M	13/15	86.67%
	10^{-9} M	16/19	84.21%

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

	10^{-11} M	8/15	53.33%
8/03/2023	Control	7/11	63.64%
	10^{-7} M	8/11	72.73%
	10^{-9} M	4/7	57.14%
	10^{-11} M	5/11	45.45%
21/03/2023	Control	16/39	41.03%
	10^{-7} M	13/26	50.00%
	10^{-9} M	17/39	43.59%
	10^{-11} M	17/34	50.00%
28/03/2023	Control	15/20	75.00%
	10^{-7} M	13/21	61.90%
	10^{-9} M	18/21	85.71%
	10^{-11} M	7/17	41.18%
09/05/2023	Control	7/15	46.67%
	10^{-7} M	5/15	33.33%
	10^{-9} M	8/15	53.33%
	10^{-11} M	4/15	26.67%
24/05/2023	Control	9/16	56.25%
	10^{-7} M	5/11	45.45%
	10^{-9} M	5/18	27.78%
	10^{-11} M	5/19	26.32%
14/06/2023	Control	8/17	47.06%
	10^{-7} M	11/16	68.75%
	10^{-9} M	8/13	61.54%
	10^{-11} M	9/16	56.25%

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

Tabla 6. Número de blastocistos obtenidos y tasa de blastulación de embriones por tratamiento y fecha

Fecha de procesamiento	Tratamiento	# Blastocistos/ovocitos maduros	Tasa de Blastulación
7/03/2023	Control	5/18	27.78%
	10^{-7} M	7/15	46.67%
	10^{-9} M	8/19	42.11%
	10^{-11} M	3/15	20.00%
21/03/2023	Control	8/39	20.51%
	10^{-7} M	11/26	42.31%
	10^{-9} M	11/39	28.21%
	10^{-11} M	11/34	32.35%
28/03/2023	Control	5/20	25.00%
	10^{-7} M	8/21	38.10%
	10^{-9} M	9/21	42.86%
	10^{-11} M	4/17	23.53%

Tabla 7. Número de ovocitos sometidos a fluorescencia con DCFDA

Fecha de procesamiento	Tratamiento	# ovocitos evaluados
26/04/2023	Control	21
	10^{-7} M	17
	10^{-9} M	23
	10^{-11} M	19
13/06/2023	Control	8
	10^{-7} M	6

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

	10^{-9} M	6
	10^{-11} M	3
04/07/2023	Control	8
	10^{-7} M	5
	10^{-9} M	8
	10^{-11} M	7

Tabla 8. Resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk

	Estadístico	Sig.
Tasa de maduración	0.9754	0.7288
Tasa de activación	0.9638	0.4281
Tasa de blastulación	0.9092	0.2084

Tabla 9. Resultados de prueba ANOVA entre grupos

	F	Sig.
Tasa de maduración	0.189	0.903
Tasa de activación	1.680	0.198
Tasa de blastulación	6.885	0.013

Almacenado digitalmente en el
Repositorio de Archivos Externo (RAE)
Subido por: 11100075

Fecha: 2025-05-09 00:00:26

Tabla 10. Resultados de prueba post hoc de comparaciones múltiples Tukey

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
Control	Melatonina 10^(-7)	-17.93000*	0.025
	Melatonina 10^(-9)	-13.29700	0.095
	Melatonina 10^(-11)	-.86333	0.998
Melatonina 10^(-7)	Control	17.93000*	0.025
	Melatonina 10^(-9)	4.63300	0.776
	Melatonina 10^(-11)	17.06667*	0.032
Melatonina 10^(-9)	Control	13.29700	0.095
	Melatonina 10^(-7)	-4.63300	0.776
	Melatonina 10^(-11)	12.43367	0.122
Melatonina 10^(-11)	Control	.86333	0.998
	Melatonina 10^(-7)	-17.06667*	0.032
	Melatonina 10^(-9)	-12.43367	0.122

*La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.