



ANEXO 1

FORMATO PARA LA PRESENTACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN  
CON EL FINANCIAMIENTO DEL FEDU

1. Título del proyecto

**MODULACIÓN DEL COMPLEJO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIARIO-TESTICULAR EN ALPACAS**

2. Área de Investigación

Área de investigación	Línea de Investigación	Disciplina OCDE
BIOMEDICAS	CIENCIA Y PRODUCCIÓN ANIMAL	REPRODUCCION ANIMAL

3. Duración del proyecto (meses)

**12 meses**

4. Tipo de proyecto

Individual	<input type="radio"/>
Multidisciplinario	<input checked="" type="radio"/>
Director de tesis pregrado	<input type="radio"/>

4. Datos de los integrantes del proyecto

Apellidos y Nombres	OLIVERA MAROCHO, LUIS VICENTE ZÚÑIGA ZÚÑIGA, CIRIACO TEODORO CALSIN CALSIN, BILO WENCESLAO QUIÑONES GARCÍA, JOSE IVAN ORMACHEA VALDEZ, EDWIN
Escuela Profesional	MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
Celular	998060200
Correo Electrónico	lvolvera@unap.edu.pe

I. Título

**MODULACIÓN DEL COMPLEJO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIARIO-TESTICULAR EN ALPACAS**

II. Resumen del Proyecto de Tesis (Debe ser suficientemente informativo, presentando -igual que un trabajo científico- una descripción de los principales puntos que se abordarán, objetivos, metodología y resultados que se esperan)

El control endocrino reproductivo se basa en la dinámica neuroendocrina desde el hipotálamo a la hipófisis, de factores de liberación hasta la síntesis, almacenamiento y secreción hormonal generados en la hipófisis. Informaciones sobre el complejo hipotálamo-hipofisiario son bastos en animales de laboratorio, para alpacas son escasas. El objetivo del estudio determinará la organización del complejo hipotálamo-



hipofisiario en época de lluvia y seca, focalizando la organización de los núcleos supraóptico y paraventricular con presencia de la hormona oxitocina; lóbulo anterior para la secreción de las hormonas de la reproducción FSH y LH y epitelio seminífero. Los animales provendrán del CE La Raya de la UNAP, donde 12 machos de saca, sanos, considerando 6 adultos y 6 jóvenes, con observación del comportamiento sexual; se beneficiarán 2 machos, de ambas edades, cada dos meses. Luego del beneficio se aislará del encéfalo el hipotálamo e hipófisis, además biopsias de testículo; una vez identificadas serán inmersas en soluciones de paraformaldehído 4%; PBS, 0,1 M; pH, 7,2., y glutaraldehído 2.5%; en el laboratorio de Histología y Embriología, las muestras serán procesadas en base a técnicas histológicas en parafina, reacciones histoquímicas e inmunohistoquímicas, y Microscopía Electrónica para obtener características citológicas del complejo hipotálamo-hipofisiario, como redes neuronales, actividad neuroendocrino, pinocitosis, almacenamiento microvascularización y testicular relacionado con la secreción de hormonas de la reproducción. Los datos se analizarán mediante métodos estadísticos descriptivos. Los resultados obtenidos permitirán comprender aspectos de la fisiología reproductiva, como es el comportamiento sexual de alpaca macho en periodos de lluvia y seca del altiplano y su aplicabilidad en biotecnologías

### III. Palabras clave

Hipotálamo, infundíbulo, hipófisis, células gonadotropinas, hormonas hipofisarias

### IV. JUSTIFICACIÓN

La crianza de alpacas siendo una actividad económica y social importante en los pobladores altoandinos, como fuente de proteínas mediante su carne y características especiales de la fibra para la industria textil. Estas bondades ofrecidas por los camélidos precisan mejor manejo tecnológico (Gutiérrez *et al.*, 2018).

Estudios de la actividad neuroendocrina en la reproducción se ha descrito a profundidad en ratones y conejos que son base para hacer analogías en otras especies, pero para el caso de la alpaca requiere su propio estudio o análisis.

Se conoce que el hipotálamo es la fuente de factores de liberación para las diferentes hormonas relacionadas con la reproducción, caso de las hormonas Folículo Estimulante y Luteinizante que son responsables de la dinámica folicular, ondas espermáticas que conducen a la producción de gametos y su viabilidad en formar un nuevo ser.

En caso de alpacas, que son animales de ovulación inducida por cópula (Sumar, 1996), donde su habitat es un ambiente hipóxico, el cual modula una fisiología propia frente a animales que viven a menores altitudes. Hace que esta actividad fisiológica de altura sea investigada para definir valores, constantes, dinámica organogénica y su comprensión como un todo para las aplicaciones en todas las áreas biomédicas

Por lo que, el presente estudio considerando hasta el momento la escasa información sobre la modulación del complejo hipotálamo-hipofisiario en relación a la onda espermática, según la edad y época de crianza, identificará la actividad secretora de las células gonadotrópicas localizadas en el lóbulo anterior de la hipófisis, productoras de las hormonas FSH, LH, responsables de la espermatogénesis y



espermioogénesis en los túbulos seminíferos del testículo, así como la modulación de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo en la síntesis, transporte de la hormona oxitocina y su almacenamiento en el lóbulo posterior de la hipófisis. Todo este complejo hormonal se mostrará integrado por la microvascularización y red nerviosa. Los resultados del estudio servirán para la aplicación en la fisiología y biotecnologías reproductivas propio para camélidos sudamericanos.

- V. Antecedentes del proyecto (Incluya el estado actual del conocimiento en el ámbito nacional e internacional. La revisión bibliográfica debe incluir en lo posible artículos científicos actuales, para evidenciar el conocimiento existente y el aporte de la Tesis propuesta. Esto es importante para el futuro artículo que resultará como producto de este trabajo)

Durante la génesis de la hipófisis está comprometido dos áreas embrionarias específicas, el diencéfalo que dará origen al lóbulo posterior que corresponde a un tejido nervioso, por otro lado, la base de la cavidad bucal originando el lóbulo anterior, muy celularizado, que se conectará con el anterior. señalan que la hipófisis o pituitaria es una glándula endocrina pequeña, en forma de frijol que se localiza en la silla turca, una depresión en la superficie del hueso esfenoides, está cubierta por el diafragma selar situado justo por debajo del quiasma óptico, esta glándula consta de dos partes (hipófisis anterior o adenohipófisis y la hipófisis posterior o neurohipófisis) Léger, (2010).

Histológicamente la adenohipófisis está dividida por trabéculas fibrosas en dos alas la laterales y el área de cuña mucoide central que se puede ver en la sección transversal horizontal, el lóbulo anterior está compuesto principalmente por células productoras de hormonas, al teñir con hematoxilina y eosina se pueden distinguir tres tipos de células acidófilos dispuestos especialmente en las alas laterales, los basófilos localizados principalmente en la región de cuña mucoide y los cromófbos dispersos por todo el lóbulo anterior). El lóbulo posterior de la neurohipófisis este compuesto principalmente por pituicitos que son células gliales con papel de apoyo, estas células alargadas poseen largos procesos citoplasmáticos y en las personas mayores contienen gránulos de pigmento amarillo-marrón. Las fibras nerviosas no mielinizadas que se originan en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo se entremezclan con los pituicitos y capilares (Ross & Pawlina, 2008)

El lóbulo anterior o hipófisis anterior está conformado por células elaboradoras de diferentes hormonas conocidas como célula lactotrofas, que son sintetizadoras de seis hormonas: somatotrofos (hormona del crecimiento; GH), tirotrofos (tirotropina u hormona estimulante de la tiroides; TSH), lactótrofos (prolactina; PRL), gonadotrofos (hormona foliculoestimulante; FSH y hormona luteinizante; LH) y corticotrofos (corticotropina u hormona adrenocorticotrópica; ACTH), Alatzoglou et al., (2020).

La última década ha transformado la visión de este órgano clave. Tradicionalmente, la pituitaria ha sido vista como una colección de células organizadas al azar que responden a los estímulos hipotalámicos secretando su contenido. Sin embargo, estudios recientes han establecido que las células pituitarias están organizadas en redes a gran escala estrechamente conectadas que se comunican entre sí de manera tanto homo como heterotípica, lo que permite que la glándula se adapte rápidamente a las demandas fisiológicas cambiantes. Estas redes decodifican e integran funcionalmente los estímulos hipotalámicos y sistémicos y sirven para optimizar la



salida pituitaria en la generación de pulsos hormonales fisiológicamente significativos. El desarrollo de métodos de imágenes en 3D y modelos transgénicos nos ha permitido ampliar la investigación de las redes hipofisarias funcionales en varias clases de vertebrados (Santiago-Andres et al., 2021)

En todos los vertebrados, el principal impulsor de la secreción pituitaria es la entrada hipotalámica. Factores liberados por la neurona hipotalámica terminales en el sistema del portal pituitario se unen a su cognado receptores en las células hipofisarias diana y provocan una cascada de señalización que induce la liberación (o inhibición) de la secreción hormonal de la pituitaria. En el sistema vascular de manera pulsátil, cuyo patrón es crítico en la regulación de la actividad del órganos diana ( Le Tissier, 2016).

Últimamente, con auxilio de imágenes de alta resolución en combinación con registros de actividad celular a gran escala se reveló la disposición de la red homotípica y heterotípica de las células pituitarias de los mamíferos, es decir, conectividad intercelular entre el mismo tipo de célula secretora o entre diferentes células tipos, respectivamente. Investigación en este campo ha señalado la relevancia de la organización de la red en la coordinación de secreción sincronizada y rítmica de hormonas ( Mollard, et al., 2012; Le Tissier et al., 2012).

Un proceso donde la regulación hipotalámica de la hipófisis no tiene en cuenta el cambio en la liberación de hormonas que ofrece gonadotrofos y secreción de LH a lo largo del ciclo estral. LH y la secreción de FSH son necesarias para la maduración del folículo y ovulación en las hembras, pero se secretan diferencialmente a través del ciclo reproductivo. Por ejemplo, en proestro el patrón de la secreción del pulso de LH se convierte en un mecanismo de aumento que ha sido visto en gran medida como consecuencia del aumento de GnRH, el principal factor estimulante de las gonadotropas en el hipotálamo. Sin embargo, el estímulo de GnRH per se no es el fenómeno causal que no puede aumentar la capacidad de respuesta y la secreción por gonadotrofos (Herbison et al., 2008; Edwards, 2017).

A partir de experimentos *ex vivo*, donde las interacciones de los tejidos son preservadas, la red de gonadotropas revela dinámica y adaptación plástica en el proestro a través de un aumento en la célula (probablemente involucrando proliferación celular y transdiferenciación). Los gonadotrofos también aumentan la relación célula-célula. contactos (que involucran la motilidad celular), y el aumento de protuberancias hacia otros gonadotrofos y al sistema vascular (Edwards, 2017; Alim, et al., 2012). En conjunto, estas modificaciones celulares y cambios en la capacidad de respuesta a la GnRH durante el ciclo, dan cuenta de la regulación en el ritmo y el modo de secreción de LH en diferentes fases del ciclo reproductivo (Herbison et al., 2008;

Además, la cantidad de secreción de gonadotropina es influenciado por el equilibrio de las hormonas en el eje reproductivo e incluye una reconfiguración en la conectividad de la red y este cambio está asociado, pero no es una consecuencia de la GnRH estímulo (Edwards, 2017, Alim, et al., 2012). Esta conectividad se construye principalmente a través del contacto soma-soma y extensiones citoplasmáticas en las que comunicación intercelular mediada por uniones gap o citosólica la conexión está involucrada. Sin embargo, si la red de gonadotropas es cableadas sólo por contacto célula-célula, uno podría esperar que las células en estrecha proximidad entre sí, deben presentar un patrón similar de responder y formar grupos donde los grados de sincronización puede ser el más alto (Hodson et al., 2012, Göngrich et al., 2016).



En caso de machos, la espermatogénesis es un evento bioquímico complejo que involucra la participación del hipotálamo y la glándula pituitaria a través de la secreción de la hormona hipotálamo GnRH y dos hormonas hipofisarias FSH y LH. Por lo tanto, el eje hipotálamo-pituitario-testicular es un eje regulador crucial para la función testicular. Estudios recientes han demostrado que, en el microambiente del epitelio seminífero, en el que cada célula de Sertoli sustenta ~30-50 células germinales en diferentes etapas de su desarrollo, los factores autocrinos y paracrinos producidos localmente también están involucrados en la espermatogénesis, en particular a nivel de uniones celulares. Estas uniones celulares en la interfaz Sertoli-Sertoli y Sertoli-célula germinal son cruciales para coordinar diferentes eventos de espermatogénesis mediante el envío de señales de ida y vuelta entre Sertoli y las células germinales. Para regular con precisión la renovación de las células espermatogoniales por mitosis, la progresión del ciclo celular, la meiosis, la espermiogénesis, el movimiento de las células germinales a través del epitelio, la espermiación y la apoptosis de las células germinales (Cheng et al., 2009).

El túbulo seminífero es la unidad funcional del testículo que produce espermatozoides (haploides, 1n) a partir de espermatogonias (diploides, 2n) durante la espermatogénesis. La espermatogénesis tiene lugar en el epitelio seminífero del túbulo seminífero, que se compone de cuatro fases distintivas: mitosis, meiosis, espermiogénesis y espermiación que ocurren durante las 14 etapas del ciclo epitelial seminífero de espermatogénesis en ratas, 12 etapas en ratones y 6 etapas en los hombres. El epitelio seminífero está compuesto por células de Sertoli y células germinales adyacentes a la túnica propia en contacto físico con la membrana basal. La espermatogénesis está respaldada por la hormona pituitaria hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona sexual masculina testosterona producida por las células de Leydig en el intersticio con el receptor de FSH y el receptor de andrógenos restringidos a las células de Sertoli en el epitelio seminífero (Kretser et al., 1988; Walker et al., 2009). En resumen, la célula de Sertoli en el epitelio seminífero es el objetivo tanto de la FSH como de la testosterona, lo que ilustra su papel crucial en la espermatogénesis para apoyar la maduración de las células germinales (Sharpe et al., 1994, Walker et al., 2009). Además, los estrógenos también juegan un papel importante en el desarrollo de las células germinales, como la apoptosis (Shaha et al., 2008).

En caso de la oxitocina se sintetiza en el hipotálamo, concretamente en las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular (PVN) y en las neuronas magnocelulares tanto del PVN como del núcleo supraóptico (SON). La oxitocina también se produce en otras áreas del cerebro fuera del hipotálamo, aunque en cantidades mucho más pequeñas. Hay varias formas en que la OXT producida en el hipotálamo llega a otras regiones hipotalámicas, por ejemplo, al núcleo ventromedial (NVM), así como a otras áreas del cerebro, la médula espinal y la circulación periférica. Primero, la liberación de OXT ocurre localmente, desde las somatodendritas dentro del PVN y el SON. Además, la liberación de OXT ocurre distalmente, en las terminales sinápticas que surgen de los axones que se originan en las neuronas del PVN y el SON (McCormack et al., 2020).

La secreción y la respuesta de oxitocina están relacionadas con la ingesta de alimentos, un comportamiento que tiene una clara variación circadiana. Como resultado, se han estudiado las posibles interacciones entre los ritmos circadianos y/o ultradianos y la señalización de oxitocina (Zhang & Cai, 2011)

Se ha propuesto que la eyaculación está bajo el control de las hormonas



neurohipofisarias, por lo que se cree que la oxitocina es la principal hormona que facilita la emisión de semen y ha sido el centro de interés en la eyaculación durante más de 40 años. Los niveles de oxitocina en plasma aumentan alrededor del momento de la eyaculación en carneros, toros, conejos y hombres. El aumento de oxitocina durante la eyaculación puede ser importante para la espermatogénesis, ya que se ha demostrado que la oxitocina aumenta periféricamente el volumen y la concentración de esperma en el eyaculado en varias especies. Además, se propone que para el aumento de los niveles de oxitocina alrededor del momento de la eyaculación es que la oxitocina tiene un papel fisiológico en la modulación de la actividad contráctil en todo el tracto eyaculatorio masculino, lo que ayuda al transporte de esperma. Se ha demostrado que la oxitocina, tanto in vivo como in vitro, aumenta la contractilidad del epidídimo, los conductos deferentes y la próstata de humanos, conejos, ratones y ratas (Gupta et al., 2008)

**VI. Hipótesis del trabajo** (Es el aporte proyectado de la investigación en la solución del problema)

El periodo de lluvia y de seca como la edad en alpacas modifican el comportamiento de la citología productora de hormonas FSH, LH y oxitocina del complejo hipotálamo - hipofisiario reflejado en variaciones del epitelio del túbulo seminífero

**VII. Objetivo general**

Determinar la organización del complejo hipotálamo-hipofisiario-testicular en alpacas macho durante épocas de lluvia y seca en edad adulta y juvenil

**VIII. Objetivos específicos**

Establecer la dinámica neuronal de los núcleos supraóptico y paraventricular en la producción y almacenamiento de oxitocina  
Demostrar las redes de comunicación celular comprometida con la secreción hormonal de FSH, LH y oxitocina  
Establecer la organización microvascular de los componentes de complejo hipotálamo-hipofisiario.

**IX. Metodología de investigación** (Describir el(los) método(s) científico(s) que se empleará(n) para alcanzar los objetivos específicos, en forma coherente a la hipótesis de la investigación. Sustentar, con base bibliográfica, la pertinencia del(los) método(s) en términos de la representatividad de la muestra y de los resultados que se esperan alcanzar. Incluir los análisis estadísticos a utilizar)

**Lugar:**

El presente trabajo de investigación se llevará a cabo en dos lugares a) en el Centro experimental La Raya, para la obtención de las muestras y b) en el laboratorio de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno, que se encuentra situado en el distrito, provincia y departamento de Puno –Perú, a una altitud de 3825 m. s. n. m. En ella se procesará las muestras de acuerdo a protocolos establecidos

**Animales:** Para el presente estudio se utilizarán 12 machos de saca clínicamente



sanos, considerando 6 machos adultos y 6 alpacas juveniles.

### **Obtención de las muestras**

Una vez beneficiado los animales, se diseccionará el encéfalo para aislar el hipotálamo e hipófisis, así como testículos y serán procesados bajo los siguientes protocolos

### **PROCESAMIENTO EN LA TÉCNICA HISTOLÓGICA EN PARAFINA**

Muestras provenientes del hipotálamo, hipófisis y testículo serán inmersas en solución fijadora tamponada de paraformaldehído 4%; PBS, 0,1 M; pH, 7,2 considerándose una primera etapa como un proceso de prefijación, luego de ella se recortará en tamaños menores, adecuados para seguir con la fijación definitiva por 24h. Seguidamente se procederá con el siguiente protocolo:

- Lavado, en agua continua (24 horas)
- Deshidratación, en etanol desde 50 a 100% por 1h en cada uno.
- Diafanización, en cloroformo por 1h
- Inclusión, en parafina, con punto de fusión 58°C, tres cambios de 1h.
- Cortes, utilizando el micrótopo tipo Minot, con 4 micras de espesor.
- Cortes seriados, en muestras seleccionadas a fin de seguir obtener detalles en estudio, en caso de la microvascularización se priorizará el recorrido de arteriolas, vénulas y su red capilar.

- **Baterías de Coloración:**

**Hematoxilina de Harris y Eosina** (núcleo y citoplasma),

**Van Gieson Orceina** (fibras musculares, elásticas y colágenas)

1. 2x10 min en xileno para desparafinar.
2. 2x10 min en etanol 100°
- 3.- 10 min en etanol 96°
4. 10 min en etanol 80°
5. 10 min en etanol 50°
6. 5 min en H2O destilada
7. 10 min en hematoxilina férrica de Weigert.
8. 5 min en H2O corriente
9. 1 min en H2O destilada
10. 4 a 5 min con picrofucsina de Van Gieson
11. 2 x 30 s en H2O acidificada
12. 3 x 1 min en etanol 100°
13. 2 x 5 min en xileno
14. Montado con medio de montaje

**Reacción de PAS+** para detectar presencia de glucoproteínas

- 1.- 2x10 min en xileno para desparafinar
- 2.- 2x10 min en etanol 100°
- 3.- 10 min en etanol 96°
- 4.- 10 min en etanol 80°
- 5.- 10 min en etanol 50°
- 6.- 5 min en H2O destilada
- 7.- Ácido peryódico al 0.5 % en H2O destilada durante 5 min
- 8.- Varios lavados en H2O destilada



- 9.- Reactivo de Schiff durante 30 min en oscuridad (
- 10.- 5 min en H<sub>2</sub>O corriente
- 11.- Varios lavados en H<sub>2</sub>O destilada
- 12.- 5 min en hematoxilina de Mayer
- 13.- 15 min en H<sub>2</sub>O corriente
- 14.- 20 s en H<sub>2</sub>O destilada
- 15.- 5 min en etanol 80°
- 16.- 5 min en etanol 96°
- 17.- 2x10 min en etanol 100°
- 18.- 2x10 min en xileno
- 19.- Montado con medio de montaje

#### **Impregnación argéntica para identificar redes neuronales y microfibrillas**

- 1.-Desparafinar e hidratar hasta agua destilada
- 2.-Ácido fosfomolibdico al 10% durante 10 minutos
- 3.-Enjuagar con agua destilada
- 4.-Nitrato de uranilo durante 30 segundos
- 5.-Enjuagar con agua destilada
- 6.-Solución de plata amoniacal de Wilder (filtrar y tapar) durante 5 minutos
- 7.-Lavar con alcohol 96
- 8.-Reductor de Wilder durante 1 minuto
- 9.-Lavar con agua destilada
- 10.-Virado al oro
- 11.-Lavado con agua destilada
- 12.- Hiposulfito de sodio durante 5 minutos
- 13.-Montaje en medios convencionales

#### **Tinción de Nissl para determinar la organización neuronal**

- 1.- 2x10 min en xileno para desparafinar
- 2.- 2x10 min en etanol 100°
- 3.- 10 min en etanol 96°
- 4.- 10 min en etanol 80°
- 5.- 10 min en etanol 50°
- 6.- 5 min en H<sub>2</sub>O destilada
- 7.- 5-10 min solución de violeta de cresilo (CAS: 10510-54-0) al 0.1 %.
- 8.- Lavado rápido en H<sub>2</sub>O destilada.
- 9.- Diferenciar en etanol de 96° durante varios minutos y comprobar el proceso con el microscopio.
- 10.- 2x10 min en etanol 100°
- 11.- 2x10 min en xileno
- 15.- Montado con medio de montaje: Entellan o con Bálsamo de Canadá.

La lectura de láminas se realizará con ayuda del microscopio NIKON-eclipse 2000 dotado de un software y acoplado a un monitor del cual se podrá adquirir las imágenes para la documentación del trabajo.

#### **FIJACIÓN Y PROCESAMIENTO DEL MATERIAL PARA OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO**

Para la observación al microscopio electrónico las muestras serán fijadas en



glutaraldehído 2,5% en tampón fosfato 0,1M, pH 7,2. Los fragmentos serán lavados en tampón fosfato 0,1M, pH 7,2 y post fijado en tetróxido de osmio 1%, por 1 hora. Seguidamente lavados en tampón fosfato y deshidratados en concentraciones crecientes de etanol (de 70 a 100%) terminando en óxido de propileno.

Durante 12 – 16 horas, los materiales serán puestos sobre agitación en una mezcla 1:1 de óxido de propileno y resina Spurr. En seguida, esta mezcla será substituida por resina pura, donde los materiales permanecerán por más de 4 a 5 h. Luego de este periodo, las muestras se colocarán en moldes con resina pura. Una vez incluidos, los materiales se colocarán a 60°C por 72 h. para la polimerización de la resina.

Para la localización de áreas específicas serán seleccionadas cortes usando un micrótopo Sorvall, modelo “Porter-Blum” MT-1. Cortes semifinos de 1 micra de espesura se obtendrán y coloreados con una solución acuosa de borato de sodio 1% en agua destilada, conteniendo 0,25% de azul, de Toluidina para observación al microscopio de luz.

Localizadas las regiones para el estudio ultra-estructural, en el mismo micrótopo se obtendrán cortes ultrafinos, plateados, de 60 nm de espesura.

Estos cortes luego colectados en redes de cobre y contrastados por acetato de uranila 2% en agua destilada, durante 5 min, y por el citrato de plomo 0,5% en agua destilada, durante 10 min. La observación ultra-estructural y la documentación fotográfica fueron realizadas en los microscopios electrónicos “Zeiss” EM-9AS2 y ”JEOL” CX-II-100.

El análisis de las imágenes a obtener reforzará la identificación de uniones y comunicaciones intracelulares, organelas relacionadas en la síntesis de actividad secretora, microcirculación, organización del citoesqueleto del complejo hipotálamo-hipofisario.

#### X. Referencias (Listar las citas bibliográficas con el estilo adecuado a su especialidad)

- Sumar, J. B. (1996). Reproduction in llamas and alpacas. *Animal Reproduction Science*, 42(1–4), 405–415. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01538-2](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01538-2)
- Gutierrez, G. A., Gutierrez, J. P., Huanca, T., & Wurzinger, M. (2018, February). Challenges and opportunities of genetic improvement in alpacas and llamas in Peru. In *Proceedings of the World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Auckland, New Zealand (pp. 12-16).
- Alatzoglou KS, Gregory LC, Dattani MT. (2020) Development of the Pituitary Gland. *Compr Physiol*. 2020 Mar 12;10(2):389-413. doi: 10.1002/cphy.c150043. PMID: 32163208.
- Léger, J. (2010). Hipófisis. *EMC-Pediatría*, 45(3), 1-16.
- Ross, M & Pawlina, W. (2008). *Histología, Texto y Atlas color-Biología Celular y Molecular*. 5ta Edic. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
- Santiago-Andres Y, Golan M, Fiordeliso T. (2021). Functional Pituitary Networks in Vertebrates. *Front Endocrinol (Lausanne)*. Jan 27;11:619352. doi: 10.3389/fendo.2020.619352. PMID: 33584547; PMCID: PMC7873642.



- Le Tissier P, Campos P, Lafont C, Romanò N, Hodson DJ, Mollard P. An updated view of hypothalamic-vascular-pituitary unit function and plasticity. *Nat Rev Endocrinol* (2017) 13:257–67. doi: 10.1038/nrendo.2016.193
- Mollard P, Hodson DJ, Lafont C, Rizzoti K, Drouin J. A tridimensional view of pituitary development and function. *Trends Endocrinol Metab* (2012) 23:261–9. doi: 10.1016/j.tem.2012.02.004
- Le Tissier PR, Hodson DJ, Lafont C, Fontanaud P, Schaeffer M, Mollard P. Anterior pituitary cell networks. *Front Neuroendocrinol* (2012) 33:252–66. doi: 10.1016/j.yfrne.2012.08.002
- Herbison AE, Porteous R, Pape J-R, Mora JM, Hurst PR. Gonadotropin releasing hormone neuron requirements for puberty, ovulation, and fertility. *Endocrinology* (2008) 149:597–604. doi: 10.1210/en.2007-1139
- Edwards BS, Clay CM, Ellsworth BS, Navratil AM. Functional Role of Gonadotrope Plasticity and Network Organization. *Front Endocrinol* (2017) 8:223. doi: 10.3389/fendo.2017.00223
- Alim Z, Hartshorn C, Mai O, Stitt I, Clay C, Tobet S, et al. Gonadotrope plasticity at cellular and population levels. *Endocrinology* (2012) 153:4729–39. doi: 10.1210/en.2012-1360
- Göngrich C, García-González D, Le Magueresse C, Roth LC, Watanabe Y, Burks DJ, et al. Electrotonic Coupling in the Pituitary Supports the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in a Sex Specific Manner. *Front Mol Neurosci* (2016) 9(65):1–12. doi: 10.3389/fnmol.2016.00065
- Hodson DJ, Schaeffer M, Romanò N, Fontanaud P, Lafont C, Birkenstock J, et al. Existence of long-lasting experience-dependent plasticity in endocrine cell networks. *Nat Commun* (2012) 3:605. doi: 10.1038/ncomms1612
- Cheng CY, Wong EW, Yan HH, Mruk DD. Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: new insights and advances. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Feb 5;315(1-2):49-56. doi: 10.1016/j.mce.2009.08.004. Epub 2009 Aug 12. PMID: 19682538; PMCID: PMC3516447.
- Kretser, D. and Kerr, J. (1988) The Cytology of the Testis. In: Knobil, E., et al., Eds., *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York, 837-932.
- Walker WH. Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. *Steroids*. 2009; 74:602–607
- Sharpe, RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E.; Neil, JD., editors. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1994. p. 1363-1434.
- Shaha, C. Estrogens and spermatogenesis. In: Cheng, CY.; Austin, TX., editors. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media; 2008. p. 42-64.
- McCormack SE, Blevins JE, Lawson EA. Metabolic Effects of Oxytocin. *Endocr Rev*. 2020 Apr 1;41(2):121–45. doi: 10.1210/endo/bnz012. PMID: 31803919; PMCID: PMC7012298.
- Zhang G, Cai D. Circadian intervention of obesity development via resting-stage



feeding manipulation or oxytocin treatment. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011 Nov;301(5):E1004-12. doi: 10.1152/ajpendo.00196.2011. Epub 2011 Aug 9. PMID: 21828335; PMCID: PMC3214005.

Gupta J, Russell R, Wayman C, Hurley D, Jackson V. Oxytocin-induced contractions within rat and rabbit ejaculatory tissues are mediated by vasopressin V1A receptors and not oxytocin receptors. *Br J Pharmacol.* 2008 Sep;155(1):118-26. doi: 10.1038/bjp.2008.226. Epub 2008 Jun 16. PMID: 18552879; PMCID: PMC2527840.

**XI. Uso de los resultados y contribuciones del proyecto (Señalar el posible uso de los resultados y la contribución de los mismos)**

Los resultados esperados podrán aportar conceptos de la sincronía celular en la producción hormonal en alpacas desde el complejo hipotálamo-hipofisiario y como ellas modulan la diferenciación del epitelio testicular, desde espermatogonias hasta espermatozoides, además contribuirá conceptos en la fisiología reproductiva de los camélidos sudamericanos y la aplicación en biotecnologías reproductivas.

**XII. Impactos esperados**

**i. Impactos en Ciencia y Tecnología**

Conceptos en la fisiología reproductiva de camélidos sudamericanos  
Aplicación en biotecnologías reproductivas, optimizando uso de reproductores

**ii. Impactos económicos**

En base al conocimiento de la fisiología reproductiva y su aplicación se optimizará animales que sean más rentables para el productor-poblador altoandino. Por tanto, ingreso que ayudará en la economía.

**iii. Impactos sociales**

Al tener mejor manejo de animales, la condición de persona del productor se valora, como mejor vida, alimentación saludable y buena salud que repercute a toda su familia

**iv. Impactos ambientales**

El presente estudio no modificará el medio ambiente

**XIII. Recursos necesarios (Infraestructura, equipos y principales tecnologías en uso relacionadas con la temática del proyecto, señale medios y recursos para realizar el proyecto)**

**INFRAESTRUCTURA**

Laboratorio de histología y Embriología, áreas de:

Procesamiento de muestras

Microscopía de campo claro

Microscopía de inmunofluorescencia



### **EQUIPOS**

Microscópio de campo claro  
Microscópio de contraste de fase  
Microscopio de fluorescencia  
Microscopio Electrónico de Transmisión  
Estufas de calor seco  
Micrótopo de rotación  
Baño de flotación  
Microscopio Electrónico de Transmisión  
Ultramicrotomo

### **REACTIVOS**

Paraformaldehído  
Glutaraldehído  
Alcohol absoluto (etanol) al 100%  
Xilol  
Cloroformo  
Parafina histológica 56°C  
Cuchillas descartables histológicas  
Pinzas de Leuckart.  
Pinzas de disección  
Baterías de coloración:  
    Hematoxilina y Eosina,  
    Van Giesson Orceína,  
    Tricrómica de Masson,  
    Gránulos citoplasmáticos  
Histosec  
Fracos  
Láminas porta y cubreobjetos  
Juego de 5 Micropipetas  
Reactivos para microscopia electrónica  
Kit inmunohistoquímica para detección hormonal: FSF, LH, Oxitocina  
tetróxido de ósmio,  
*low viscosity embedding media* (Spurr's kit);  
Inmunoglobulinas: IgG de cabra biotinilada anti-IgG de conejo, IgG de cabra biotinilada anti-IgG de rata, IgG de cabra biotinilada anti-IgG de ratón, IgG bovina biotinilada anti-IgG de conejo.  
Suero bovino fetal (**SBF**)  
Azul brillante de Coomassie  
Acetato de sodio, nitrato de plomo, nitrato de plata, sulfito de amonio, ácido clorhídrico, ácido fórmico, peróxido de hidrógeno, clorito de sodio, extran neutro, óxido de propileno, tampón fosfato-salina (**PBS**), glutaraldehído, paraformaldeido, paraplast, poli-L-lisina,  $\beta$  glicerofosfato de sodio, albumina sérica bovina (**BSA**), tampón tris fosfato-salina (**TBS**), tetróxido de ósmio

#### **XIV. Localización del proyecto (indicar donde se llevará a cabo el proyecto)**

Se realizará en el Laboratorio de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano



**XV. Cronograma de actividades**

Actividad	Trimestres											
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Presentación y revisión bibliográfica del proyecto	X											
Adquisición de materiales	X		X			X			X			
Toma de muestras	X		X		X		X		X		X	
Procesamiento de muestras óptica y electrónica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Lectura y análisis		X		X	X	X		X		X	X	
Presentación de informes			X			X			X			x
Preparación de artículo						X				X	X	x

**XVI. Presupuesto**

Descripción	Unidad de medida	Costo Unitario (S/.)	Cantidad	Costo total (S/.)
Glutaraldehído	10 x 10ml	300	5	1,500
Paraformaldehído	kg	300	1	300
Parafina	kg	100	5	500
Cuchillas descartables	Cj.	120	5	600
Alcohol absoluto	Lt	100	5	500
Xilol	Lt	120	4	480
Entellan	Lt	150	1	150
Cloroformo	Lt	130	3	390
Kit Pinzas de disección	Pz	400	2	800
Colorantes histoquímicos	Gr	250	15	3,750
Kit micropipetas	Und	600	5	3,000
Kit inmunohistoquímica	Und	8000	4	32,000
Kit Spurr's MET	Und	8000	1	8,000
Kit VEGF	mL	2000	1	2,000
Poli-L-lisina	mL	350	2	700
<b>TOTAL</b>				<b>58,550</b>