



## INFLUENCIA DE LAS HORMONAS FOLÍCULO ESTIMULANTE, LUTEINIZANTE Y GONADOTROPINA CORIÓICA EQUINA EN LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS Y CLIVAJE DE EMBRIONES DE ALPACA

### INFLUENCE OF FOLLICLE-STIMULATING, LUTEINIZING HORMONES AND EQUINE CHORIONIC GONADOTROPIN ON *IN VITRO* MATURATION OF OOCYTES AND CLEAVAGE OF ALPACA EMBRYOS

Ulises S. Quispe Gutiérrez<sup>1</sup>, Teodosio Huanca Mamani<sup>2</sup>, Luis V. Olivera Marocho<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, av. inca garcilazo de la vega s/n tamburco, Abancay, Apurímac, Perú. \*e-mail: [ulisessandro@yahoo.com](mailto:ulisessandro@yahoo.com).

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Innovación Agraria, estación experimental agraria illpa

<sup>3</sup> Universidad Nacional Del Altiplano, facultad de medicina veterinaria y zootecnia

#### RESUMEN

La producción de embriones *in vitro* de alpacas está aún en etapas iniciales. El objetivo fue evaluar la influencia de hormonas folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH) y gonadotropina coriónica equina (eCG) en la maduración *in vitro* de ovocitos y clivaje de embriones de alpacas. Realizado en el Laboratorio de Fertilización *in vitro* del CIP Quimsachata, Estación Experimental ILLPA Puno. Los ovocitos se recuperaron de ovarios de alpaca faenadas, los de categoría A y B fueron madurados en medio TCM – 199 (Incubadora a 6.1% de CO<sub>2</sub>; 5% de O<sub>2</sub>; 38.5 °C con alta humedad), en grupos de tratamientos (T) suplementados con gonadotropinas, T1: eCG 15 UI mL<sup>-1</sup> sin FSH y LH; T2: FSH 0.25 µg mL<sup>-1</sup> + LH 2.5 µg mL<sup>-1</sup> sin eCG; T3: FSH 0.25 µg mL<sup>-1</sup> + LH 2.5 µg mL<sup>-1</sup> + eCG 15 UI mL<sup>-1</sup>, durante 36 h, luego, fertilizados con 2 µL de semen (4 x 10<sup>6</sup> espermatozoides mL<sup>-1</sup>) en medio Fertil TALP por 12 h y cultivados en medio SOF por 48 h. Se obtuvo mayor porcentaje ( $P \leq 0.05$ ) de ovocitos en metafase II: 46.9% en T3, 41.0% en T2 versus T1. Se encontró mayor tasa ( $P \leq 0.05$ ) de clivaje (2 a 8 células a 48 h de cultivo): 22.4% en T3, 17.8% en T2 en comparación con T1. Se concluye que las gonadotropinas FSH, LH afectan positivamente la maduración de ovocitos *in vitro* repercutiendo en el clivaje de embriones de alpacas.

**Palabras clave:** división embrionaria, gonadotropina, metafase, oocito y Vicugna pacos.

#### ABSTRACT

The production of *in vitro* embryos of alpacas is still in early stages. The objective was to evaluate the influence of follicle stimulating (FSH), luteinizing hormone (LH) and equine chorionic gonadotropin (eCG) hormones on the *in vitro* maturation of oocytes and cleavage of alpaca embryos. Performed in the *in vitro* Fertilization Laboratory of CIP Quimsachata, ILLPA Puno Experimental Station. The oocytes recovered from ovaries of alpaca slaughtered, the of category A and B were matured in TCM-199 medium (incubator at 6.1% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 38.5 °C with high humidity), in treatment (T) groups supplemented with gonadotropins, T1: eCG 15 IU mL<sup>-1</sup> without FSH and LH; T2: FSH 0.25 µg mL<sup>-1</sup> + LH 2.5 µg mL<sup>-1</sup> without eCG; T3: FSH 0.25 µg mL<sup>-1</sup> + LH 2.5 µg mL<sup>-1</sup> + eCG 15 IU mL<sup>-1</sup>, for 36 h, then, fertilized with 2 µL of semen (4 x 10<sup>6</sup> sperm mL<sup>-1</sup>) in Fertil TALP medium for 12 h and cultivated in SOF medium for 48 h. A higher percentage ( $P \leq 0.05$ ) of metaphase II oocytes was obtained: 46.9% in T3, 41.0% in T2 versus T1. A higher rate ( $P \leq 0.05$ ) of cleavage was found (2 to 8 cells at 48 h of culture): 22.4% in T3, 17.8% in T2 compared to T1. It is concluded that FSH, LH gonadotropins positively affect *in vitro* oocyte maturation, having an impact on the cleavage embryos of alpaca.

**Key words:** embryonic division, gonadotropin, metaphase, oocyte and Vicugna pacos.

\*Autor para correspondencia: [ulisessandro@yahoo.com](mailto:ulisessandro@yahoo.com)





## INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos juegan un rol social y económico en el Perú, Bolivia, Chile y Argentina. No solo se encuentran en estos países, sino se extendieron por todo el mundo en los últimos años, principalmente las alpacas y llamas, por la producción de fibra de alta calidad y como animales de compañía (Sumar, 2007; Aba, 2014). La fertilidad cada vez es afectada; alrededor del 20% de las alpacas no preñan después del apareamiento (Brown, 2000), el intervalo entre partos es largo, se obtienen pocas crías durante su vida reproductiva. Además, el mejoramiento genético para obtener animales de alta calidad requiere de varios años, por tanto, hay necesidad de acortar los tiempos y mejorar las dificultades de fertilidad de alpacas a través del uso de biotecnologías reproductivas como una alternativa.

La producción de embriones *in vitro* es una opción para lograr progreso genético en menor tiempo; sin embargo, esta aún no es eficiente en camélidos, avanza lentamente frente a otras especies tradicionales (Tibary *et al.*, 2005), por lo que se encuentran en etapas iniciales (Leisinger *et al.*, 2014). Los factores que limitan el resultado óptimo de la producción de embriones *in vitro* son varios (Tibary *et al.*, 2005), los medios de cultivo juegan un papel esencial en cada etapa de cultivo, fundamentalmente durante la maduración de ovocitos. El efecto de las gonadotropinas y su importancia en la maduración de ovocitos, fertilización y el desarrollo temprano del embrión siguen siendo controversiales (Chian *et al.*, 2003).

El fundamento de utilizar FSH y LH en la maduración *in vitro*, se basa en el mecanismo de acción que ocurre *in vivo*; sin embargo, probablemente sean diferentes. En el bovino Yak, la adición de FSH al medio de maduración *in vitro* tuvo mayor efecto sobre aumento de niveles de expresión de mRNA de RFSH y RLH (Xiao *et al.*, 2014). En ovinos, durante la maduración *in vitro* de ovocitos, los niveles de expresión de los mRNA y las proteínas de RFSH en los complejos cúmulo – ovocito tratados con FSH fueron más elevados que en los grupos tratados con LH (Wei *et al.*, 2018). Las tasas de maduración *in vitro* de ovocitos son menores, cuando no se usa gonadotropinas en medio de maduración (Galli y Moor, 1991; Salgado *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013), la administración conjunta de suplementos de rFSH, rLH en medio de maduración *in vitro* mejora el desarrollo embrionario, tanto en ovocitos bovinos, humanos y murinos, eleva el número de ovocitos maduros hasta los eventos iniciales embrionarios (Anderiesz *et al.*, 2000).

Existe antecedentes sobre maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca en metafase II donde suplementaron gonadotropinas, en mayoría utilizando dosis única y a diferentes tiempos de maduración, reportándose: 42.9% (Huanca *et al.*, 2010); 34.3 y 37.9% (Leisinger *et al.*, 2014); 47.9% (Arriaga *et al.*, 2014); 71.2 y 74.2% (Pacompia, 2017); 68.5 y 75.3% (Huanca *et al.*, 2014); 65.1% (Ruiz *et al.*, 2017); 64.9 y 53.8% (Condori *et al.*, 2010) de maduración. También hay antecedentes sobre tasa de clivaje de embriones de alpaca 15.4% (Huanca *et al.*, 2010); 15.6 y 19.8% (Huanca *et al.*, 2014). 33.1% (Condori *et al.*, 2010). 27.1% (Gamarra *et al.*, 2008); 79.3% (Ruiz *et al.*, 2017) de clivaje. Sin embargo, las informaciones del uso de diversas concentraciones de FSH y LH son pocas. Por las consideraciones mencionadas, se planteó el presente estudio con el objetivo de evaluar la maduración de ovocitos *in vitro* y el clivaje de embriones de alpaca, mediante la suplementación de diversas dosis de FSH, LH y eCG en medio de maduración.





## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Laboratorio de Fertilización *in vitro* del Centro de Investigación y Producción Quimsachata de la Estación Experimental ILLPA Puno, del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ubicado a 15°47'42.6" Latitud Sur; S 70°37'25.2" Longitud Oeste, a 4153 m de altitud (Google, 2018). Pertenece a zona agroecológica de puna seca (Cárdenas *et al.*, 1015), caracterizada por épocas lluviosa y seca, con temperatura promedio anual 7 °C (3 °C de mayo a Julio, 15 °C entre setiembre y diciembre) y con precipitación pluvial anual 400 a 688 mm (Huanca *et al.*, 2007).

Se utilizaron ovocitos de alpacas Huacaya adultas no preñadas, de categoría A y B (n = 248), para la maduración *in vitro* suplementados con gonadotropinas: Hormona Folículo Estimulante FSH (Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Canada), Hormona Luteinizante LH (Sigma), Gonadotropina Coriónica Equina eCG (Folligon®, MSD). Se formaron tres grupos de tratamientos (T) con cinco repeticiones, T1: eCG 15 UI mL<sup>-1</sup> sin FSH y LH; T2: FSH 0.25 µg mL<sup>-1</sup> + LH 2.5 µg mL<sup>-1</sup> sin eCG; T3: FSH 0.25 µg mL<sup>-1</sup> + LH 2.5 µg mL<sup>-1</sup> + eCG 15 UI mL<sup>-1</sup>, en el que se distribuyeron ovocitos recuperados al azar en diferentes momentos para la maduración de ovocitos *in vitro*.

Todos los químicos y reactivos que se utilizaron en el experimento fueron del laboratorio Sigma, salvo se mencione lo contrario.

### *Obtención de ovarios y transporte*

Los ovarios se obtuvieron de centros de beneficio de alpacas de Santa Lucía, Ayaviri y Nuñoa del departamento de Puno, Perú. Se retiraron los ovarios del tracto reproductivo de las alpacas, dentro de los 15 min posteriores al degüello. El transporte de ovarios se realizó según descrito por Huanca *et al.* (Huanca *et al.*, 2014) con algunas modificaciones que consistió en colocar los ovarios en un termo conteniendo cloruro de sodio al 0.9%, suplementado con penicilina 100000 UI, 100 mg de estreptomycin, 250 µg de anfotericina B por litro, se mantuvieron a temperatura entre 35 a 37 °C y transportados al laboratorio entre 6 a 8 h.

### *Recuperación y evaluación de ovocitos*

En el laboratorio, los ovarios fueron colocados en un vaso precipitado de 500 mL que contenía cloruro de sodio al 0.9% con los mismos componentes del transporte, se mantuvieron en baño María a 37 °C. Seguidamente se realizó el lavado de los ovarios, dos a tres veces con solución salina hasta eliminar restos de sangre, luego se retiró el mesovario y mesosálpinx.

Sobre una platina térmica a 37 °C, se realizó la recuperación de ovocitos (n = 2910) mediante corte folicular según descrito por Arriaga *et al.* (Arriaga *et al.*, 2014) con ciertas modificaciones que consistió en seccionar folículos de 2 a 6 mm de diámetro aproximadamente, luego con ligera presión al folículo el contenido folicular se recuperó a una placa Petri que contenía fosfato buffer salino (PBS) suplementado con albúmina sérica bovina (BSA) al 2%. Con uso de estereomicroscopio (Meiji Techno) a 2x o 4x con platina temperada a 37 °C, utilizando micropipetas de 0.2 a 10 µL, se aspiraron el complejo cúmulo – ovocito y se colocaron en gotas de PBS + BSA en las que se lavaron en cuatro gotas sucesivas.

La evaluación de los ovocitos se realizó según las características morfológicas, de acuerdo a la descripción de (Hawk y Wall, 1994), clasificando en tres tipos de ovocitos: categoría A: calidad buena;





categoría B: calidad intermedia; categoría C: rechazados. Luego de la clasificación, los ovocitos se colocaron en cuatro gotas sucesivas de medio de maduración TCM – 199 y luego se transfirieron a placas donde contenían las gotas de medio de maduración.

#### *Maduración in vitro de ovocitos*

La maduración de ovocitos se realizó de acuerdo a lo descrito por Ratto *et al.* (2005) con algunas modificaciones. Se utilizó ovocitos de categoría A y B, estos se colocaron en grupos de 8 a 16 ovocitos en gotas de 80  $\mu\text{L}$  de medio de maduración, en placas Petri de 30 x 15 mm cubiertos con aceite de mineral. La maduración se realizó en incubadora de  $\text{CO}_2$  mantenidos con 6.1% de  $\text{CO}_2$ ; 5% de  $\text{O}_2$ ; a 38.5  $^\circ\text{C}$  con alta humedad similar al que usó Leisinger *et al.* (2014) durante 36 h. Las placas de cultivo con medio de maduración se colocaron al menos 2 h antes de colocar los ovocitos dentro de la cámara de  $\text{CO}_2$ .

El medio de maduración estuvo compuesto por TCM – 199 con 10 mM HEPES, 2.0 mM  $\text{NaHCO}_3$  suplementado con 10% de suero fetal bovino, 0.2 mM de piruvato de sodio, 0.6 mM de cisteína, 0.25 mM de glutamina, 10  $\text{ng mL}^{-1}$  de EGF; 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de 17  $\beta$  estradiol, FSH (0.25; 0.50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), LH (2.5; 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), eCG (5; 15 UI  $\text{mL}^{-1}$ ), 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de gentamicina.

Luego de 36 h de incubación de ovocitos, aproximadamente un tercio de ovocitos fueron fijados con etanol / ácido acético para su posterior evaluación de maduración, el resto de los ovocitos se destinaron a fertilización *in vitro*.

#### *Evaluación de la maduración in vitro de ovocitos*

La maduración de ovocitos se evaluó según la morfología del estado nuclear según descrito por Ruiz *et al.*, (2017) con modificaciones, donde los ovocitos incubados por 36 h en cámara de  $\text{CO}_2$  fueron retirados y colocados en gotas de PBS, luego, transferidos a viales de 0.5 mL que contenía PBS, seguidamente, fueron vortezados a 1800 rpm por 3 min, con la finalidad de retirar las capas del cúmulo del ovocito. Posteriormente, los ovocitos vortezados nuevamente fueron lavados en gotas de PBS para luego ser colocados en viales que contenía la solución fijadora compuesta por ácido acético / etanol (1: 3) por 48 h.

La tinción se realizó según descrito por Huanca *et al.*, (2014) con algunas modificaciones. Se colocaron 5 a 10 ovocitos por lámina portaobjeto, cubiertos con el cubreobjeto sujeto en las cuatro puntas con vaselina. Se ejerció una ligera presión sobre el cubreobjeto hasta entrar en contacto con los ovocitos, evitando dañarlos. Se agregó la tinción de Lacmoid al 2% por capilaridad, luego de 20 min aproximadamente se evaluó utilizando microscopio a objetivo 100 x. Los ovocitos fueron clasificados según descrito por Ratto *et al.*, (2005), como vesícula germinal, vesícula germinal rota, metafase I, metafase II, degenerados. Se consideró ovocito maduro nuclearmente cuando se alcanzó a la etapa de metafase II.

#### *Obtención y capacitación de espermatozoides*

La colección del semen de alpaca se realizó con maniquí acondicionada con vagina artificial según utilizado por Bravo *et al.*, (1997) con modificaciones. Se utilizaron dos alpacas machos adultos de fertilidad conocida. El macho se mantuvo montado al maniquí alrededor de 15 a 25 min. El semen colectado se mantuvo en baño María a 37  $^\circ\text{C}$ , luego, fue evaluado macro y microscópicamente y diluido





con dilutor comercial OptiXcell (Agua bidestilada 2: dilutor 1), la dilución del semen fue a concentración de  $4 \times 10^6$  espermatozoides por mL (Conde *et al.*, 2008). Conocida la viabilidad del espermatozoide se utilizó para la inseminación *in vitro*. La evaluación de la motilidad se realizó en cada colección, constituyéndose como patrón para el uso del semen para la fertilización *in vitro*.

La capacitación espermática se realizó mediante la técnica de Gradiente de Percoll discontinuo (Percoll 45 y 22.5%) utilizado por Arriaga *et al.*, (2014) con ciertas modificaciones que consistió, en colocar un tubo cónico de 15 mL dentro del baño María a 37 °C, al que se colocó lentamente 500 µL de Percoll al 45% seguido de otra cantidad igual de Percoll al 22.5%, luego se colocó semen diluido 500 µL. En seguida, se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min, luego se eliminó el sobrenadante y se resuspendió con 1000 µL de medio TALP- Sperm al que se adicionó 40 µL de PHE (2 mM Penicilamina, 1 mM Hipotaurina y 250 mM Epinefrina), más 10 µg mL<sup>-1</sup> de heparina, seguidamente se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. El sobrenadante se eliminó y se adicionó 1000 µL de Fertil - TALP, luego, se homogenizó y se mantuvo a 37 °C hasta su utilización.

El medio TALP - Sperm se preparó con los componentes utilizados por Bavister *et al.* (1977) compuesto por: 100 mM NaCl; 2 mM CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O, 3.1 mM KCl, 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 21.6 mM lactato de Na, 1 mM piruvato de Na, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES, 0.6% (p/v) BSA fracción V, 25 µg mL<sup>-1</sup> de gentamicina.

#### *Fertilización in vitro*

El complejo cúmulo ovocito madurados *in vitro* en nueve grupos, después de 36 h de maduración, fueron lavados con medio de fertilización Fertil - TALP cuatro veces, luego fueron colocados entre 10 a 30 ovocitos en gotas de 50 µL de Fertil - TALP, en seguida, fueron inseminados con 2 µL de suspensión de espermatozoides capacitados (concentración de  $4 \times 10^6$  espermatozoides mL<sup>-1</sup>, 25% de motilidad). La co-incubación fue durante 12h en la cámara de CO<sub>2</sub> mantenidos con 6.1% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, a 38.5 °C con alta humedad.

El medio Fertil - TALP se preparó con los componentes utilizados por Bavister *et al.* (1977) compuesto por: 114 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0.4 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 11 mM lactato de Na, 0.2 mM Piruvato de Na, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.6% (p/v) BSA libre ácidos grasos, 25 µg mL<sup>-1</sup> de gentamicina.

#### *Clivaje de embriones después de la maduración in vitro de ovocitos con gonadotropinas*

Los presuntos cigotos fueron lavados con medio Fluido Oviductal Sintético (SOF), luego fueron cultivados en 500 µL de SOF, entre 25 a 50 presuntos cigotos durante 48 h en incubadora de CO<sub>2</sub> mantenidos con 6.1% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, a 38.5 °C con alta humedad.

El medio SOF se preparó con los componentes utilizados por Holm *et al.* (1999) con ligera modificación compuesto por: 107.7 mM NaCl, 7.2 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 µg mL<sup>-1</sup> rojo fenol, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>.2HO, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 5.4 mM DL-lactato de Na, 7.3 mM piruvato de Na, 0.2 mM L-glutamina, 3 mg mL<sup>-1</sup> BSA fracción V, 45 µL mL<sup>-1</sup> BEN aminoácidos esenciales, 5 µL mL<sup>-1</sup> MEN aminoácidos no esenciales, 10 ng mL<sup>-1</sup> EGF, 0.3 mM ácido cítrico, 2.8 mM Myo-inositol, 2% de SFB, 50 µg mL<sup>-1</sup> gentamicina.





La evaluación de la división embrionaria se realizó observando las características morfológicas del embrión utilizando el estereomicroscopio. La división de células se expresó como tasa de clivaje de 2 a 8 células (cantidad de embriones divididos sobre cantidad de presuntos ovocitos madurados) evaluados a 48 h (Día 0 = día de la fertilización).

Los datos obtenidos de la maduración nuclear del ovocito y del desarrollo embrionario, fueron analizados en base a las transformaciones y según variables a raíz cuadrada y valores angulares, luego, se realizó el análisis de varianza y se utilizó el procedimiento Modelo Lineal Generalizado (GLM) del Sistema de Análisis Estadístico (SAS v 9.4). Para comparar las diferencias entre grupos se usó la prueba de Bonferroni. Los resultados fueron considerados significativos cuando  $P \leq 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Maduración nuclear en metafase II de ovocitos*

Los resultados de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca se muestran en la Tabla 1, se obtuvo mayor ( $P \leq 0.05$ ) porcentaje de maduración de ovocitos en metafase II en los tratamientos suplementados con FSH  $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$  + LH  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  + eCG 0 o  $15 \text{ UI mL}^{-1}$  versus tratamiento eCG  $15 \text{ UI mL}^{-1}$  sin FSH y LH.

El porcentaje de ovocitos con vesícula germinal entre los diferentes grupos de tratamiento fueron similares ( $P > 0.05$ ). Se encontró mayor ( $P \leq 0.05$ ) porcentaje de ovocitos con vesícula germinal rota en los tratamientos FSH  $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$  + LH  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  + eCG 0 o  $15 \text{ UI mL}^{-1}$  en contraste al tratamiento eCG  $15 \text{ UI mL}^{-1}$  sin FSH y LH. El porcentaje de metafase I de ovocitos entre los tratamientos fueron similares ( $P > 0.05$ ). Hubo menor ( $P \leq 0.05$ ) cantidad de ovocitos degenerados en los tratamientos FSH  $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$  + LH  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  + eCG 0 o  $15 \text{ UI mL}^{-1}$  en comparación con el tratamiento sin FSH y LH con eCG  $15 \text{ UI mL}^{-1}$ .

**Tabla 1.** Porcentaje de maduración *in vitro* de ovocitos, utilizando FSH, LH y eCG, y tasa de clivaje de embriones en alpacas (réplicas = 5).

Tratamiento			Ovocitos	Etapa de maduración nuclear					Presuntos cigotos	Clivaje
FSH	LH	eCG		Número de ovocitos (%)						
( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	( $\text{UI mL}^{-1}$ )	n	GV	GVBD	MI	MII	DG	n	Número de embriones (%)
0	0	15	84	4 (4.8%)	33 (39.3%) <sup>a</sup>	8 (9.5%) <sup>a</sup>	7 (8.3%) <sup>a</sup>	32 (38.1%) <sup>a</sup>	171	7 (4.1%) <sup>a</sup>
0.25	2.5	0	83	6 (7.2%)	20 (24.1%) <sup>b</sup>	11 (13.3%) <sup>a</sup>	34 (41.0%) <sup>b</sup>	12 (14.5%) <sup>b</sup>	163	29 (17.8%) <sup>b</sup>
0.25	2.5	15	81	6 (7.4%)	16 (19.8%) <sup>b</sup>	11 (13.6%) <sup>a</sup>	38 (46.9%) <sup>b</sup>	10 (12.3%) <sup>b</sup>	156	35 (22.4%) <sup>b</sup>

GV: vesícula germinal, GVBD: vesícula germinal rota, MI: metafase I, MII: metafase II, DG: degenerado. Superíndices de letras diferentes dentro de la misma columna expresan diferencia ( $P \leq 0.05$ ).

En el presente estudio, la suplementación conjunta de FSH, LH tuvo un efecto favorable sobre la maduración meiótica de ovocitos. La dosis de  $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$  de FSH +  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de LH con o sin uso de eCG tuvieron mayores porcentajes (41.0 y 46.9%) de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca en





metafase II que el tratamiento que usó eCG  $15 \text{ UI mL}^{-1}$  sin FSH y LH. Estos resultados son similares a los reportes de porcentajes de maduración de ovocitos en metafase II de alpacas: 42.9% para 34 h de maduración con  $0.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de FSH más  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de hCG (Huanca *et al.*, 2010); 34.3 y 37.9% para alpacas jóvenes y adultas, utilizando  $15 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  de FSH,  $1 \text{ } \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  de LH (Leisinger *et al.*, 2014); 47.9% con suplemento de FSH durante 20 h completándose las otras 20 h sin FSH (Arriaga *et al.*, 2014). 49.2% en cultivo expuesto 21 h con FSH más 21 h sin FSH, donde utilizaron  $0.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de FSH más  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de hCG en medio de maduración *in vitro* (Condori *et al.*, 2010); También son similares a los reportes de porcentajes de maduración *in vitro* de ovocitos en llamas: 52%, suplementados con  $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de FSH,  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de LH (Sansinena *et al.*, 2003);

En esta investigación el efecto favorable de gonadotropinas sobre la maduración *in vitro* de complejos cúmulo ovocito en alpacas, probablemente se debería a las expresiones de mRNAs de los receptores de FSH y LH en los que estas gonadotropinas actuarían en el complejo cúmulo ovocito, luego desencadenarían las secuencias de eventos moleculares que favorecerían la reanudación meiótica del ovocito hasta la progresión a metafase II. La FSH y LH tienen receptores en las células del cúmulo del ovocito, en cultivo *in vitro* se identificó la presencia de mRNA para los FSHR en ovocitos bovinos (Chian *et al.*, 2003). La FSH fue más efectiva que la LH en la maduración *in vitro* de ovocitos de yak, debido a que en los complejos cúmulo ovocito hubo niveles más altos de receptores de FSH que de LH; por tanto, la adición de FSH al medio de maduración *in vitro* tuvo mayor efecto sobre el aumento de niveles de expresión del mRNA del RFSH y RLH versus suplementación de LH (Xiao *et al.*, 2014).

Los resultados de los tratamientos  $0.25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de FSH +  $2.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de LH con o sin uso de eCG, encontrados en el presente estudio sobre maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca en metafase II (41.0 y 46.9%) son mayores que los resultados informados por Del Campo *et al.* (1994), quienes reportaron 30.4% de maduración *in vitro* de ovocitos de llamas en metafase II, a 30 h de cultivo, suplementados con  $0.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de FSH,  $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de LH. Esta diferencia probablemente se atribuya a la composición del medio de maduración, dado que en el presente experimento el medio se suplementó con cisteína, glutamina y EGF. Se informó que la adición de cisteína  $0.3 \text{ mM}$  al medio de fertilización mejora las tasas de fertilización *in vitro* y favorece el progreso embrionario hasta la etapa de blastocisto de los ovocitos de búfalo (Abu-El *et al.*, 2017). La LH actúa a través de las células del cúmulo para aumentar el metabolismo de la glutamina dentro de ovocitos rodeados de células del cúmulo intactas y en ovocitos maduros desnudos; es probable que esto represente un medio por el cual la LH mejora la calidad de ovocitos durante el proceso de maduración *in vitro*. Se demostró que el EGF facilita la maduración *in vitro* de los ovocitos de oveja y mejora la capacidad del embrión para un mayor desarrollo (Yong *et al.*, 2017).

Las tasas de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca en metafase II (41.0 y 46.9%) encontrados en el presente estudio, son inferiores a otros reportes en alpacas donde utilizaron gonadotropinas en medio de maduración *in vitro* de ovocitos: 71.2 y 74.2% para concentraciones 1:5 (FSH : LH) y 2:10 (FSH : LH) (Pacompiá, 2017); 68.5 y 75.3% para 38 y 42 h de maduración, en el que utilizaron  $0.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de FSH,  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de hCG (Huanca *et al.*, 2014); 65.1% después de 32 h de cultivo, al suplementar con  $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de FSH, (Ruiz *et al.*, 2017); 64.9 y 53.8% en cultivo expuesto con FSH por 42 h y 21 h sin FSH más 21 h con FSH, donde utilizaron  $0.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de FSH más  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de hCG en medio de maduración *in vitro* (Condori *et al.*, 2010). También son inferiores los resultados del presente experimento a los reportes en llamas: 77.7, 80.6 y 80.4% para 28, 30 y 36 h de maduración, donde usaron  $0.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de FSH (Ratto *et al.*, 2005); 70.2 y 70.5% para 36 y 42 h de maduración, en el que suplementaron con 0.02 unidades  $\text{mL}^{-1}$  de FSH (Ayuque *et al.*, 2014).



Las tasas inferiores de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca encontradas en el presente estudio versus otros estudios, probablemente se atribuyan a las concentraciones de dosis de las gonadotropinas, dado que en el presente estudio se utilizó hasta  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de FSH más  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de LH como dosis máxima. Se reportan altas tasas de maduración de ovocitos de llamas cuando utilizaron mayor dosis de gonadotropinas  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de FSH más  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de LH: 77% (Sansinena *et al.*, 2007). Aunque, al suplementar con FSH  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , obtuvieron 65.1% de maduración ovocitos de alpaca en metafase II (Ruiz *et al.*, 2017). En combinación con análogos de hormonas como hCG obtuvieron 68.5 y 75.3% de tasa de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca, al usar  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de FSH,  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de hCG (Huanca *et al.*, 2014). Es difícil determinar la dosis de gonadotropinas y/o hCG que se utilizará, especialmente en caso de protocolos combinados, para proporcionar un beneficio óptimo de maduración de ovocitos (Wang *et al.*, 2013). Otro factor que podría haber influido probablemente sea el ambiente de cultivo de ovocitos, dado que en otras investigaciones utilizaron 5% de oxígeno, 5% de  $\text{CO}_2$  y máxima humedad a 38 a 39 °C; en cambio en el presente estudio se utilizó 6% de tensión de oxígeno, 6.1% de  $\text{CO}_2$  a 38.5 °C, similar a los reportes de Leisinger *et al.* (2014), quienes usaron 6% de  $\text{CO}_2$ , 100% de humedad a 38 °C en la incubación de ovocitos de alpaca. Sin embargo, la tensión de oxígeno (5 vs. 20%) durante el cultivo de embriones no influyeron en la tasa de formación de blastocitos durante la producción *in vitro* de embriones de alpaca (Ruiz *et al.*, 2017).

En el presente experimento, el efecto de la eCG no fue significativo ( $P > 0.05$ ), al utilizar 0 o 15 UI  $\text{mL}^{-1}$  de eCG +  $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$  de FSH +  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de LH sobre el porcentaje de ovocitos de alpaca madurados *in vitro*. Wei *et al.* (2016) reportaron 36.5% (sin eCG ni FSH); 45.8% (eCG:  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); 46.4% (eCG:  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); 51.7% (eCG:  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); 48.5% (FSH: 10 UI  $\text{mL}^{-1}$ ) de maduración *in vitro* de ovocitos de oveja por grupo de tratamiento, respectivamente. También en cabras, la suplementación de 20 UI  $\text{mL}^{-1}$  de eCG en medio de maduración aumentó significativamente la velocidad de maduración de ovocitos de cabras, por lo que se podría utilizar en protocolos de maduración *in vitro* (Kouamo *et al.*, 2017). La eCG tiene actividad como FSH y LH en especies distintas a la equina; esta se une a los receptores de FSH prácticamente en todas las especies de mamíferos, además del equino, en el que se ha probado y produce efectos biológicos similares a la FSH; posee una interacción similar y potente con los receptores de LH (Murphy y Martinuk, 1991). Sin embargo, la eficacia real de la eCG durante la maduración *in vitro* de ovocitos aún debe examinarse en detalle. Todavía no está claro los factores que afectan la maduración *in vitro* de ovocitos de alpacas.

#### *Clivaje de embriones después de la maduración in vitro de ovocitos con gonadotropinas*

Los resultados del clivaje se muestran en la Tabla 1. Se encontró mayor ( $P \leq 0.05$ ) tasa de clivaje de embriones en los tratamientos FSH  $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$  + LH  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  + eCG 0 o 15 UI  $\text{mL}^{-1}$  que el tratamiento eCG 15 UI  $\text{mL}^{-1}$  sin FSH y LH.

Las mayores tasas de clivaje de 2 a 8 células (17.8 y 22.4%) correspondiente a tratamientos FSH  $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$  + LH  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  + eCG 0 o 15 UI  $\text{mL}^{-1}$ , encontrados en el presente estudio, son similares a los informes de Huanca *et al.* (2010), quienes reportaron 15.4% de clivaje procedentes de ovocitos de alpaca madurados *in vitro* durante 38 h en medio suplementado con  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de FSH,  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de hCG. A las 72 h de cultivo de embriones, las tasas de clivaje fueron 15.6 y 19.8% para 38 y 42 h de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca suplementadas con  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de FSH,  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de hCG (Huanca *et al.*, 2014). En llamas, el primer reporte de embriones producidos *in vitro* fue informado por Del Campo *et al.*, (1994), quienes reportaron 15.8% de división de células embrionarias (2 a 16 células). Sin embargo, son menores las tasas de clivaje encontrados en el presente experimento frente a los estudios de Condori *et al.*, (2010), quienes reportaron 33.1% de tasa de división embrionaria para



exposición de FSH durante la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca, por 21 h sin FSH más 21 h con FSH; utilizaron  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de FSH más  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de hCG en medio de maduración. Gamarra *et al.* (2008) reportaron 27.1% de tasa de división embrionaria a 72 h cultivados en medio SOFaa después de la fertilización de ovocitos de alpaca madurados *in vitro* con suplemento de FSH, LH. También, Ruiz *et al.* (2017) obtuvieron 79.3% de tasa de clivaje (2 a 8 células) a 48 h de cultivo, los ovocitos de alpaca fueron madurados *in vitro* con  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de FSH.

Las diferencias de las tasas de clivaje encontradas en el presente estudio versus resto de los reportes donde obtuvieron mayores y menores tasas de clivaje de embriones, probablemente se debe a los mismos factores descritos para la maduración *in vitro* de ovocitos de alpacas, porque son experimentos subsecuentes con las mismas muestras, el medio fertilización y el medio de cultivo de embriones fueron los mismos para todos los tratamientos. Las gonadotropinas suplementadas durante la maduración *in vitro* de ovocitos probablemente afectarían las expresiones de mRNA de los receptores de FSH y LH, desencadenando reacciones moleculares para la maduración de ovocitos. Las mayores tasas de clivaje encontrados en el presente estudio, proceden de los tratamientos de mayores dosis de FSH y LH suplementados en medio maduración.

Las diferencias de tasa de clivaje mayores o menores respecto a los resultados del presente experimento, también podrían ser afectados por el medio de fertilización, medio de cultivo de embriones, tiempo de cocultivo de espermatozoides con el ovocito, factores de cultivo, experticia del técnico entre otros factores. Las diferencias entre los diversos medios de cultivo pueden atribuirse a la composición de los medios a las diferencias en su concentración iónica (Farag *et al.*, 2013). Las condiciones óptimas para maduración y fertilización *in vitro* aún deben determinarse (Del Campo *et al.*, 1994).

## CONCLUSIONES

Las gonadotropinas influyen en la maduración nuclear en metafase II de ovocitos, como también en el clivaje *in vitro* de embriones de alpaca.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco por el apoyo de esta investigación al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) - Puno, Estación Experimental Agraria Illpa, anexo Quimsachata. Al Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA), proyecto de investigación 078\_PI, por haber contribuido en la ejecución del presente estudio. Al personal del Laboratorio de Fertilización *in vitro* del INIA: Jhonor Ccopa C., Lariza Pahuara F., Armando Nina Z., Angelina Puma I., Leonidas Hancco C. y otros. Al laboratorio de Histología-Cultivo Celular de la Universidad Nacional del Altiplano, al MSc. Ciriaco Zúñiga Z., al PhD. Bernardo Roque H. A los productores alpaqueros y personal de centros de beneficio de camélidos de Nuñoa, Ayaviri y Santa Lucía, Puno.

## LITERATURA CITADA

Aba, M. A. (2014). Anatomy and Physiology of Reproduction in the Female Llama and Alpaca. In *Llama and Alpaca Care* (pp. 140–150). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2352-6.00014-6>

Abu-El Naga, E., El-Sheikh Ali, H., Balboula, A., Ramdan Badr, M., Abd El-Moneim, M., Said Hussein, M. y Zaabel, S. (2017). Effect of Enrichment of In Vitro Fertilization Medium with Cysteine on Fertilization and Embryo Development in Buffaloes. *International Journal of Veterinary Health*





*Science y Research*, 5(6), 196–199. <https://doi.org/10.19070/2332-2748-1700039>

- Anderiesz, C., Ferraretti, A., Magli, C., Fiorentino, A., Fortini, D., Gianaroli, L. y Trounson, O. (2000). Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development in vitro. *Human Reproduction*, 15(5), 1140–1148. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.5.1140>
- Arriaga C, I., Huanca L, W., Terreros C, M., Becerra G, J. J., García H, P., & Ampuero B, A. (2014). Efecto de Temperatura y Tiempo de Almacenamiento de Ovarios de Alpacas sobre la Tasa de Maduración y división in vitro de Ovocitos. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 25(4), 477–486. <https://doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10783>
- Ayunque, A., Justiniano, E., Mendoza, J., Landeo, L. y Ruiz, J. (2014). Efecto del tiempo de maduración in vitro en la capacidad meiótica y desarrollo de embriones de llama. *Spermova*, 2(1), 99–101.
- Bavister, B. D. y Yanagimachi. (1977). The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction*, 16(2), 228–237. <https://doi.org/10.1095/biolreprod16.2.228>
- Bravo, P. W., Flores, U., Garnica, J. y Ordoñez, C. (1997). Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*, 47(3), 619–626. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00020-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00020-4)
- Brown, B. W. (2000). A review on reproduction in South American camelids. *Animal Reproduction Science*, 58(3–4), 169–195. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00081-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00081-0)
- Cárdenas, O., Sapana, R., Gonzales, M. y Mamani, R. (1015). Algunas Características de los Embriones Colectados de Vicuña (*Vicugna vicugna*) en el CIP Quimsachata del INIA Puno. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 17(3), 449–452.
- Chian, R., Buckett, W. M. y Tan, S.-L. (2003). Review In-vitro maturation of human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*, 8(2), 148–166. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60511-1](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60511-1)
- Conde, P. A., Herrera, C., Trasorras, V. L., Giuliano, S. M., Director, A., Miragaya, M. H. y Pasqualini, S. (2008). In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Animal Reproduction Science*, 109(1–4), 298–308. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.10.004>
- Condori, R. L., Huanca, W., Chileno, M., Cainzo, J., Valverde, F., J., B. J., ... Herradon, P. G. (2010). Effect of follicle-stimulating hormone addition on in vitro maturation and cleavage of alpaca (*Vicugna pacos*) embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(1), 224.
- Del Campo, M., Del Campo, C., Donoso, M., Berland, M. y Mapletoft, R. (1994). In vitro fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology*, 41(6), 1219–1229. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90479-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90479-3)
- Farag, I. M., Girgis, S. M., Zowail, M. E. y Abd El-Hafez, M. A. M. (2013). In vitro maturation of camel (*Camelus dromedarius*) cumulus-denuded oocytes. *World Applied Sciences Journal*, 26(3), 352–359. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2013.26.03.76208>
- Galli, C. y Moor, M. (1991). Gonadotrophin Requireriments for the In Vitro Maturation of Sheep and Their Subsequent Embryonic Development. *Theriogenology*, 36(6), 1083–1093.
- Gamarra, G., Huaman, E., Carpio, M., Alvarado, E., Asparrin, M. y Vivanco, H. W. (2008). First in





- vitro embryo production in alpacas (*Lama pacos*). *Reproduction, Fertility and Development*, 21(1), 177–178.
- Google. (2018). Google Earth. Retrieved from <https://www.google.es/intl/es/earth/index.html> Earth
- Hawk, H. W. y Wall, R. J. (1994). Improved yields of bovine blastocysts from in vitro produced oocytes. I. selection of oocyte and zygotes. *Theriogenology*, 41(8), 1571–1583.
- Holm, P., Booth, P. J., Schmidt, M. H., Greve, T. y Callesen, H. (1999). High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*, 52(4), 683–700. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00162-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00162-4)
- Huanca L., W., Condori P., R., Chileno M., M., García H., P., Cainzo C., J. y Becerra G., J. J. (2014). Evaluación de cuatro tiempos de cultivo sobre la tasa de maduración y división postfecundación in vitro de ovocitos de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 25(4), 468–476. <https://doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10782>
- Huanca, T., Apaza, N. y Gonzales, M. (2007). Experiencia del INIA en el fortalecimiento del banco de germoplasma de camélidos domésticos. In *XX Reunión ALPA, XXX Reunión APPA* (Vol. 15, pp. 186–194). Cusco-Perú: Arch. Latinoam. Prod. Anim.
- Huanca, W., Condori, R., Cainzos, J., Chileno, M., Quintela, L., Becerra, J. y Herredon, P. G. (2010). In vitro maturation and in vitro fertilization of alpaca (*Vicugna pacos*) oocytes: effect of time of incubation on nuclear maturation and cleavage. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(1), 327. <https://doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10782>
- Kouamo, J. y Drinker Kharche, S. (2017). FSH and LH can be substituted by eCG in maturation media for caprine embryo or parthenote production in vitro. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 08(04 (Suppl)), 123. <https://doi.org/10.4172/2157-7579-C1-025>
- Leisinger, C., Coffman, E., Coutinho da Silva, M., Forshey, B. y Pinto, C. (2014). Factors affecting in vitro maturation of alpaca (*Lama paco*) oocytes. *Animal Reproduction Science*, 150(1–2), 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.08.011>
- Murphy, B. D. y Martinuk, S. D. (1991). Equine Chorionic Gonadotropin. *Endocrine Reviews*, 12(1), 27–44. <https://doi.org/10.1210/edrv-12-1-27>
- Pacompia, H. (2017). *Efecto de las gonadotropinas en la maduración y fertilización de ovocitos en alpacas (Vicugna pacos)*. Universidad Nacional del Altiplano-Puno. Retrieved from [http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/2816/Luna\\_Mamani\\_Elizabeth.pdf?sequence=1](http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/2816/Luna_Mamani_Elizabeth.pdf?sequence=1)
- Ratto, M., Berland, M., Huanca, W., Singh, J. y Adams, G. P. (2005). In vitro and in vivo maturation of llama oocytes. *Theriogenology*, 63(9), 2445–2457. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.053>
- Ruiz, J., Paulo Santayana, R., José Mendoza, M., Leandra Landeo, J., Huamán, E., Ticllacuri, F. y Ratto, M. H. (2017). Effect of oocyte maturation time, sperm selection method and oxygen tension on in vitro embryo development in alpacas. *Theriogenology*, 95, 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.006>
- Salgado, R., Vergara, Ó. y Ramírez, L. (2010). Effect of gonadotropins on the maturation and embryo development of bovine oocytes cultured in vitro. *Rev MVZ Córdoba*, 15(1), 1954–1960.





- Sansinena, M. J., Taylor, S. A., Taylor, P. J., Denniston, R. S. y Godke, R. A. (2003). Production of Nuclear Transfer Llama ( *Lama glama* ) Embryos from *In Vitro* Matured Llama Oocytes. *Cloning and Stem Cells*, 5(3), 191–198. <https://doi.org/10.1089/153623003769645857>
- Sansinena, M. J., Taylor, S. A., Taylor, P. J., Schmidt, E. E., Denniston, R. S. y Godke, R. A. (2007). In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Animal Reproduction Science*, 99(3–4), 342–353. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.05.020>
- Sumar, J. (2007). Demographics and Herd Management Practices in South America. In R. Youngquist & W. R. Threlfall (Eds.), *Current therapy in Large Animal Theriogenology* (pp. 845–850). United States of America: Elsevier.
- Tibary, A., Anouassi, A. y Khatir, H. (2005). Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids. *Theriogenology*, 64(3), 618–638. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.016>
- Wang, X., Tsai, T., Qiao, J., Zhang, Z. y Feng, H. L. (2013). Impact of gonadotropins on oocyte maturation, fertilisation and developmental competence in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 26, 752–757. <https://doi.org/10.1071/RD13024>
- Wei, S. C., Gong, Z. D., Zhao, H. W., Liang, H. Q., Lai, L. J. y Deng, Y. Y. (2016). Equine chorionic gonadotropin influence on sheep oocyte in vitro maturation , apoptosis , and follicle-stimulating hormone receptor and luteinizing hormone receptor expression. *Genetics and Molecular Research*, 15(4), 1–13.
- Wei, S., Deng, Y., Lai, L., Liang, H. y Gong, Z. (2018). Dose-dependent effects of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone on in vitro maturation , apoptosis , secretion function and expression of follicle stimulating hormone receptor and luteinizing hormone receptor of sheep oocytes. *South African Journal of Animal Science*, 48(2), 369–378. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4314/sajas.v48i2.18>
- Xiao, X., Zi, X. D., Niu, H. R., Xiong, X. R., Zhong, J. C., Li, J. y Wang, Y. (2014). Effect of addition of FSH, LH and proteasome inhibitor MG132 to in vitro maturation medium on the developmental competence of yak (*Bos grunniens*) oocytes. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12, 30. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-30>
- Yong, H., Oh, H., Lee, S., Cheong, H., Yang, B. y Park, C. (2017). Treatment of Epidermal Growth Factor ( EGF ) enhances Nuclear Maturation of Porcine Oocytes and Stimulates Expression of ER / Golgi Transport Proteins. *Development & Reproduction*, 21(2), 131–138. <https://doi.org/doi:10.12717/DR.2017.21.2.131>

