

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO
AMBIENTE



TESIS

**INFLUENCIA DE LAS HORMONAS FOLÍCULO ESTIMULANTE,
LUTEINIZANTE Y GONADOTROPINA CORIÓNIC EQUINA EN LA
MADURACIÓN *In vitro* DE OVOCITOS Y CLIVAJE DE EMBRIONES DE
ALPACA**

PRESENTADA POR:

ULISES SANDRO QUISPE GUTIÉRREZ

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

**DOCTORIS SCIENTIAE EN CIENCIA TECNOLOGÍA Y MEDIO
AMBIENTE**

PUNO, PERÚ

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO
AMBIENTE



TESIS

INFLUENCIA DE LAS HORMONAS FOLÍCULO ESTIMULANTE,
LUTEINIZANTE Y GONADOTROPINA CORIÓNICAS EQUINAS EN LA
MADURACIÓN *In vitro* DE OVOCITOS Y CLIVAJE DE EMBRIONES DE
ALPACA

PRESENTADA POR:

ULISES SANDRO QUISPE GUTIÉRREZ

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORIS SCIENTIAE EN CIENCIA TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE

APROBADA POR EL SIGUIENTE JURADO:

PRESIDENTE


.....
Dr. ELISEO PELAGIO FERNANDEZ RUELAS

PRIMER MIEMBRO


.....
Dra. ROXANA DEL CARMEN MEDINA ROJAS

SEGUNDO MIEMBRO


.....
Dr. BILO WENCESLAO CALSIN CALSIN

ASESOR DE TESIS


.....
Dr. LUIS VICENTE OLIVERA MAROCHO

Puno, 16 de agosto de 2018

ÁREA: Ciencia, tecnología.

TEMA: Biotecnología de la reproducción animal.

LÍNEA: Propuestas tecnológicas por sectores productivos.

DEDICATORIA

A mi familia, en especial a mis
padres Marcelina y Julián (QEPD),
con mucho amor a mi hijita Magu.

A los seguidores de la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional del Altiplano - Puno (UNA), Escuela de Posgrado. En especial al Dr. Sc. Luis V. Olivera Marocho, quien fue el asesor principal de esta tesis que apoyó hasta la culminación. Al MSc. Ciriaco Zúniga Z. por permitir el uso del laboratorio de Histología Cultivo Celular de la UNA.
- Agradecimiento eterno al Dr. Teodosio Huanca Mamani, Coasesor de esta tesis, por el asesoramiento, conducción y apoyo con materiales de laboratorio para la ejecución de la presente investigación científica.
- Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) - Puno, Estación Experimental Agraria Illpa, anexo Quimsachata. Al personal del Laboratorio de Fertilización in vitro del INIA: Jhonor Ccopa C., Lariza Pahuara F., Armando Nina Z., Angelina Puma I., Leonidas Hanco C., quienes apoyaron directamente en la ejecución de la presente tesis.
- Extensivo agradecimiento al personal de la EEA Illpa, anexo Quimsachata, MVZ. Mario Lino Gonzales, MVZ. Oscar Cárdenas M., MVZ. Rómulo Sapana V., MSc. Rubén Mamani C., Lic Gladys (Administradora), Sr. Juanito, Sr. Atanacio Ancalla y otros. A los compañeros tesisistas, practicantes: Dina, Nora, David, Janet, Milenka, Luis Miguel y otros.
- A los administradores de los centros de beneficio de la Municipalidad Distrital de Nuñoa, Ayaviri, Santa Lucía, Puno; Chichas Callalli, Arequipa; productores alpaqueros y comerciantes de ganado alpacuno, quienes permitieron la colección de ovarios de alpaca.
- A los jurados evaluadores de esta tesis Dr. Eliseo Pelagio Fernández Ruelas, Dra. Roxana Del Carmen Medina Rojas, Dr. Bilo Wenceslao Calsin Calsin, quienes revisaron y apoyaron en la mejor redacción de la tesis.
- A las demás personas que contribuyeron la realización de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Marco teórico	3
1.1.1. Ovogénesis	3
1.1.2. Foliculogénesis	4
1.1.3. Maduración de ovocitos	8
1.1.3.1. Maduración nuclear	8
1.1.3.2. Maduración citoplasmática	14
1.1.4. Clasificación de ovocitos	14
1.1.5. Maduración <i>in vitro</i> del ovocito	15
1.1.5.1. Tiempo de maduración <i>in vitro</i> del ovocito	16
1.1.5.2. Condiciones de cultivo en la maduración del ovocito	16
1.1.5.3. Medios de maduración <i>in vitro</i> del ovocito	17

1.1.5.3.1. Hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH)	21
1.1.5.3.2. Gonadotropina coriónica equina (eCG)	24
1.1.6. Evaluación de maduración de ovocitos	26
1.1.7. Fertilización <i>in vitro</i>	28
1.1.7.1. Medios de fertilización	28
1.1.7.2. Capacitación espermática	29
1.1.7.3. Fecundación <i>in vitro</i>	32
1.1.8. Cultivo de embriones	34
1.1.8.1. Medios de cultivo de embriones	35
1.1.8.2. Morfología y calidad embrionaria	36
1.2. Antecedentes	39

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1. Identificación del problema	50
2.2. Enunciados del problema	51
2.3. Justificación	51
2.4. Objetivos	52
2.4.1. Objetivo general	52
2.4.2. Objetivos específicos	53
2.5. Hipótesis	53
2.5.1. Hipótesis general	53
2.5.2. Hipótesis específicas	53

CAPÍTULO III**MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1. Lugar de estudio	54
3.2. Población	54
3.3. Muestra	54
3.4. Método de investigación	54
3.4.1. Maduración nuclear en metafase II de ovocitos de alpaca con gonadotropinas en cultivo <i>in vitro</i>	55
a) Obtención de ovarios y transporte	55
b) Recuperación y evaluación de ovocitos	55
c) Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos	56
d) Evaluación de la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos	57
e) Obtención y capacitación de espermatozoides	57
f) Fertilización <i>in vitro</i>	58
3.4.2. Clivaje de embriones después de la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos donde se utilizó diferentes dosis de gonadotropinas	59
a) Cultivo embrionario	59
b) Evaluación de la división embrionaria	60
3.4.3. Análisis estadístico	60

CAPÍTULO IV**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1. Maduración nuclear en metafase II de ovocitos de alpaca con gonadotropinas en cultivo <i>in vitro</i>	63
4.2. Clivaje de embriones después de la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos donde se utilizó diferentes dosis de gonadotropinas	72



CONCLUSIONES	78
RECOMENDACIONES	79
BIBLIOGRAFÍA	80
ANEXOS	90

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
1. Clasificación de ovocitos según características morfológicas previa a la maduración.	15
2. Clasificación del estado nuclear del ovocito.	28
3. Distribución de ovocitos de alpaca en grupos de tratamientos con gonadotropinas a diferentes concentraciones para la maduración <i>in vitro</i> .	61
4. Distribución de presuntos cigotos de alpaca, según grupos de tratamientos utilizados en la maduración <i>in vitro</i> , destinados a cultivo de embriones.	62
5. Porcentaje de maduración <i>in vitro</i> de ovocitos, utilizando diferentes dosis de FSH, LH y eCG, en alpacas (réplicas = 5).	65
6. División embrionaria (clivaje) a 48 h, después de la maduración <i>in vitro</i> (con diferentes concentraciones de gonadotropinas) de ovocitos de alpaca.	74
7. Análisis de varianza de etapa nuclear vesícula germinal (VG) de ovocitos madurados <i>in vitro</i> de alpaca.	95
8. Análisis de varianza de etapa nuclear vesícula germinal rota (VGBD) de ovocitos madurados <i>in vitro</i> de alpaca.	95
9. Análisis de varianza de etapa nuclear metafase I (MI) de ovocitos madurados <i>in vitro</i> de alpaca.	96
10. Análisis de varianza de etapa nuclear metafase II (MII) de ovocitos madurados <i>in vitro</i> de alpaca.	96
11. Análisis de varianza de etapa nuclear degenerados (DG) de ovocitos madurados <i>in vitro</i> de alpaca.	96
12. Análisis de varianza de clivaje embrionario de alpaca en cultivo <i>in vitro</i> .	97
13. Tests T Bonferroni (Dunn) para etapa nuclear vesícula germinal rota (VGBD) de ovocitos madurados <i>in vitro</i> de alpaca.	97
14. Tests T Bonferroni (Dunn) para etapa nuclear metafase I (MI) de ovocitos madurados <i>in vitro</i> de alpaca.	98

15. Tests T Bonferroni (Dunn) para etapa nuclear metafase II (MII) de ovocitos madurados <i>in vitro</i> de alpaca.	98
16. Tests T Bonferroni (Dunn) para etapa nuclear degenerado (DG) de ovocitos madurados <i>in vitro</i> de alpaca.	99
17. Tests T Bonferroni (Dunn) para clivaje embrionario de alpaca en cultivo <i>in vitro</i> .	99

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Esquema representativo de los factores implicados en la formación de células germinales primordiales, la ovogénesis y la foliculogénesis.	7
2. Representación esquemática del proceso de maduración meiótica de ovocitos de mamíferos. VG: Vesícula germinal; GVBD: Vesícula germinal rota.	10
3. Efecto de dos vías de liberación distintas de ácido araquidónico (AA) sobre la detención y reanudación meiótica de los ovocitos	11
4. Representación esquemática de la maduración de ovocitos inducida por LH.	13
5. Modelo hipotético para la posible participación de factores en la maduración de ovocitos humanos durante el cultivo <i>in vitro</i> .	23
6. Ovocito en etapa nuclear de metafase II observado con microscopio a objetivo 100 x.	63
7. Embrión de alpaca de cuatro células, observado con microscopio a objetivo 100 x.	73
8. a: obtención del ovario desde el aparato reproductor de la alpaca; b: recuperación de ovocitos de alpaca mediante Slicing folicular.	91
9. a: ovocitos de alpaca de categoría A y B; b: ovocitos en gotas de maduración TCM suplementado con FSH, LH, eCG según tratamientos.	91
10. Observación microscópica a objetivo 100 x a: ovocito en etapa nuclear de vesícula germinal; b: ovocito en etapa nuclear de vesícula germinal rota; c: ovocito en etapa nuclear de metafase I; d: ovocito en etapa nuclear de anafase I.	92
11. Embriones de alpaca cultivados <i>in vitro</i> en medio SOF evaluados a 48 h de cultivo. a, b: embriones en diferentes etapas de división, observado con estereomicroscopio a objetivo 2x y 4X; c: embrión de cuatro células, observado con microscopio a objetivo 100 x; d: embrión de alpaca de ocho células.	93

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
1. Colección de ovarios, recuperación y selección de ovocitos de alpaca.	91
2. Evaluación nuclear de ovocitos madurados <i>in vitro</i> y tasa de clivaje de embriones de alpaca.	92
3. Químicos y reactivos utilizados en la maduración de ovocitos, fertilización y cultivo de embriones <i>in vitro</i> .	94
4. Análisis de varianza de maduración de ovocitos y cultivo de embriones <i>in vitro</i> de alpacas.	95
5. Prueba de comparación de medias Bonferroni para maduración de ovocitos y cultivo de embriones <i>in vitro</i> de alpacas.	97

RESUMEN

La producción de embriones *in vitro* de alpacas está aún en etapas iniciales. El objetivo fue evaluar la influencia de las hormonas folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH) y gonadotropina coriónica equina (eCG) en la maduración *in vitro* de ovocitos y clivaje de embriones de alpacas. Los ovocitos se recuperaron de ovarios de alpaca faenadas, los de categoría A y B fueron madurados en medio TCM - 199, suplementados a grupos de tratamientos FSH (0; 0.25; 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), LH (0; 2.5; 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y eCG (0, 5, 15 UI mL^{-1}) durante 36 h, luego, fertilizados con 2 μL de semen (4×10^6 espermatozoides mL^{-1}) en medio Fertil TALP por 12 h y cultivados en medio SOF por 48 h. Se obtuvo mayores porcentajes ($P \leq 0.05$) de ovocitos en metafase II: 60.0; 59.0; 54.3% (grupos: FSH 0.5 + LH 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + eCG 5, 15, 0 UI mL^{-1} respectivamente) que el resto de tratamientos. Se encontró mayores ($P \leq 0.05$) tasas de clivaje (2 a 8 células a 48 h de cultivo): 30.6; 29.6; 27.3% (grupos: FSH 0.5 + LH 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + eCG 15, 5, 0 UI mL^{-1} respectivamente); 22.4; 21.1% (grupos: FSH 0.25 + LH 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + eCG 15, 5 UI mL^{-1} respectivamente) que el resto de los tratamientos que recibieron dosis bajas de gonadotropinas. 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 II, 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 (LH) and equine chorionic gonadotropin (eCG) hormones on the *in vitro* maturation of oocytes and cleavage embryos of alpaca. The oocytes were recovered from ovaries the alpaca slaughtered, the category A and B were matured in TCM-199 medium, supplemented to FSH (0, 0.25, 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), LH (0; 2.5; 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and eCG (0, 5, 15 UI mL^{-1}) treatment groups for 36 h, then, fertilized with 2 μL of semen (4×10^6 spermatozoa mL^{-1}) in Fertil TALP medium for 12 h and cultured in SOF medium for 48 h. Higher percentages ($P \leq 0.05$) of metaphase II oocytes were obtained: 60.0; 59.0; 54.3% (groups: FSH 0.5 + LH 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + eCG 5, 15, 0 UI mL^{-1} respectively) than the rest of the treatments. We found higher ($P \leq 0.05$) cleavage rates (2 to 8 cells at 48 h of culture): 30.6; 29.6; 27.3% (groups: FSH 0.5 + LH 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + eCG 15, 5, 0 UI mL^{-1} respectively); 22.4; 21.1% (groups: FSH 0.25 + LH 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + eCG 15, 5 UI mL^{-1} respectively) than the rest of the treatments that received low doses of gonadotropins. It is concluded that FSH, LH gonadotropins positively affect *in vitro* oocyte maturation, having an impact on the cleavage of alpaca embryos.

Keywords: Embryonic division, gonadotropin, metaphase II, oocyte and *Vicugna pacos*.

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 (1), (2). A pesar del fuerte impacto económico que representa la producción de camélidos domésticos y silvestres, la falta de apoyo financiero y la complejidad de los patrones reproductivos en esta especie, han avanzado muy lentamente en aspectos reproductivos (3). La fertilidad cada vez es afectada; alrededor del 20% de las alpacas no preñan después del apareamiento (4), 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 (5), por lo que se encuentran en etapas iniciales (6). Los factores que limitan el resultado óptimo de la producción de embriones *in vitro* son varios (5), los medios de cultivo juegan un papel esencial en cada etapa de cultivo, fundamentalmente durante la maduración de ovocitos. Está demostrado que la suplementación de gonadotropinas en el medio de maduración afectan las tasas de maduración de ovocitos, fertilización y desarrollo temprano de embriones. Los efectos de las diversas concentraciones de la Hormona Folículo Estimulante (FSH), Hormona Luteizante (LH), Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) individualmente o en conjunto en alpacas aún no están claros, por lo que requieren ser determinados.

Existen antecedentes de suplementación de gonadotropinas en medios de cultivo para maduración *in vitro* de ovocitos de alpacas; 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, cuyos resultados encontrados en este estudio constituyen un aporte al proceso de producción de embriones de alpaca *in vitro*

ya que las concentraciones de $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH más $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LH con 5 o 15 UI mL^{-1} de eCG influyen sobre la maduración de ovocitos y clivaje de embriones de alpaca. Por tanto, la suplementación de gonadotropinas sería necesaria para mejorar la maduración *in vitro* de ovocitos y clivaje de embriones de alpaca.

La estructura básica de esta tesis comprende: resumen, introducción, revisión de literatura, planteamiento del problema, materiales y métodos, resultados y discusión, conclusiones, recomendaciones, bibliografía y anexos.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Marco teórico

1.1.1. Ovogénesis

La ovogénesis es una secuencia de procesos donde las células germinales primitivas se transforman en ovocitos maduros. Es un proceso complejo regulado por una gran cantidad de factores intra y extra ováricos (7). La ovogénesis en la mayoría de los mamíferos progresa a través de etapas similares de desarrollo de células germinales, aunque hay una gran variación en el tiempo de cada etapa. En algunos animales domésticos están bien estudiados, pero en otros carecen de información. Una comprensión más completa de la ovogénesis en las especies domésticas conducirá al desarrollo de técnicas para mejorar la capacidad reproductiva y la calidad del rebaño (8).

Los ovocitos se originan a partir de células germinales primordiales. Dentro de los ovocitos primarios, la síntesis y acumulación del ácido ribonucleico (ARN) y proteínas durante la ovogénesis son esenciales para el crecimiento y la maduración de los ovocitos; además, es crucial para convertirse en un embrión viable después de la fertilización (7). Los ovocitos en la mayoría de los mamíferos entran en primeras etapas de meiosis durante la vida fetal; la oogonia, que se origina de las células germinales primarias, se prolifera por mitosis, los ovocitos primitivos se detienen en la etapa de profase de la primera división meiótica hasta que estén completamente desarrollados (Figura 1), están estrechamente rodeados por células somáticas, hasta llegar a la ovulación o atresia (7, 9).

Varios factores controlan la formación de células germinales primordiales. Los miembros de la familia factor de crecimiento transformante- β (TGF β) tales como proteínas morfogénicas óseas (BMP), BMP4, BMP8b (origen del ectodermo) y BMP2 (origen del endodermo) son factores específicos necesarios para la formación de células germinales primordiales y la regulación de la expresión génica (10). La reanudación de la meiosis y la progresión, a través de la maduración, dan como resultado el arresto en etapa de metafase II con la extrusión del primer cuerpo polar y un complemento del ácido desoxirribonucleico (ADN) de 1n2C. La penetración de los espermatozoides (1n1C) conduce a la extrusión del segundo cuerpo polar, el establecimiento de un estado 1n1C en el ovocito conduce a un embrión diploide (2n2C) después de la primera división mitótica post fertilización. Todas las divisiones subsiguientes son mitóticas y tienen como resultado dos células hijas idénticas (9).

El entorno folicular es responsable de mantener la detención meiótica del ovocito en la profase I y reanudar la meiosis. Altos niveles de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) intraovocitario, mantienen al ovocito en arresto meiótico, que ocurre por la supresión de la actividad del factor promotor de maduración a través de la estimulación de la proteína quinasa A dependiente de cAMP. La oleada de gonadotropina preovulatoria causa una caída en los niveles de guanosín monofosfato cíclico (cGMP) folicular, que activa la fosfodiesterasa causando la caída del cAMP dentro del ovocito, luego ocurre la reanudación meiótica. La hormona luteinizante se une a los receptores en las células somáticas, el ovocito desarrolla a metafase II, donde puede ser fertilizado (11). También puede ser inducido la reanudación de la meiosis por la liberación espontánea del ambiente folicular del complejo cúmulo ovocito (12).

1.1.2. Foliculogénesis

La foliculogénesis es el proceso de crecimiento y maduración folicular que asegura la formación de gametos femeninos funcionales; este proceso está sujeto a mecanismos complejos de regulación endocrina y paracrina; a su vez, los mecanismos de interacción celular desempeñan un papel importante como diálogo intercelular que controla la adecuada maduración ovocitaria (13). Durante la foliculogénesis, los ovocitos crecen y adquieren desarrollo de competencia en una

relación mutua dependiente con las células somáticas adyacentes. La FSH desempeña un papel esencial y establecido en la diferenciación de las células foliculares somáticas (14).

La secuencia de eventos en el desarrollo de ovocitos en mamíferos conduce a la formación de folículos primordiales. Durante el desarrollo embrionario las células germinales primordiales se forman fuera de la gónada futura y luego migran a su posición final. Las células germinales se dividen para formar quistes de células germinales y las células somáticas rodean los quistes para formar cordones ovígeros. Estos ingresan a la meiosis y se detienen al final en profase I en etapa de diploteno. Cuando las células germinales ingresan a la meiosis, se conoce como ovocitos. Los quistes de células germinales se rompen, algunos ovocitos mueren, los restantes se rodean de células somáticas formando folículos primordiales (8).

Para la formación del folículo, los ovocitos de los quistes de células germinales se separan, mediante el proceso denominado descomposición del quiste y quedan encerrados en folículos primordiales como ovocito con varias células de granulosa. Las células somáticas pregranulosas que rodean las células germinales para formar las cuerdas ovígeras, comienzan a rodear a los ovocitos individuales y se convierten en células de la granulosa. En el desarrollo folicular, los folículos primordiales, formado por un ovocito y varias células de la granulosa, tienen forma aplanada, permanecen latentes hasta que se activan para su crecimiento. El cambio en la morfología de las células granulosas de aplanadas a cuboidales, indica la activación del folículo, en este periodo al ovocito y a las células granulosas asociadas se denominan folículo primario. A medida que las células de granulosa de folículos primarios, se dividen para producir varias capas celulares, se forman los folículos secundarios o preantrales. Estos finalmente desarrollan un espacio lleno de líquido, cuando esto ocurre se clasifican como folículos antrales. Muchos folículos no sobreviven más allá de esta etapa; por lo que, los sobrevivientes se denominan folículos preovulatorios (8).

El inicio de la foliculogénesis ocurre inmediatamente después de la formación de los primeros folículos, y continúa hasta el final del período reproductivo (12 a 18 años en alpacas), incluso durante la preñez y lactancia (15). El momento del desarrollo del folículo primordial se desconoce en los camélidos sudamericanos,

en camellos ocurre entre 8 a 12 semanas. En camélidos, los ovocitos se detienen en la profase de la primera división meiótica y no progresan hasta poco antes de la ovulación. Los folículos secundarios, caracterizados por un ovocito rodeado por células granulosas cuboidales, se desarrollan en camellos de 20 a 24 semanas de gestación. La cavidad folicular se observa a las 32 a 36 semanas, mientras que los folículos grandes encapsulados con vaina folicular se observan en la semana 40 de edad fetal (16). También se desconoce el momento de la primera aparición de folículos primarios y el número de folículos primarios presentes en el nacimiento de camélidos (17). Los factores paracrinos secretados por el ovocito regulan varias funciones de las células del cúmulo. Los mecanismos por los cuales los ovocitos regulan las funciones de las células del cúmulo, incluidas las identidades de los factores secretados por los ovocitos, siguen siendo desconocidos (18).

Es evidente que el ovocito influye en el microambiente del folículo en desarrollo, al regular, a través de mecanismos paracrinos y autocrinos, su propia maduración, a su vez la proliferación de células somáticas, la diferenciación y la tasa de ovulación (19). El control molecular de la formación del quiste de células ovígeras y células germinales no se conoce bien (8). Sin embargo, varios de los principales factores reguladores derivados de ovocitos son miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta$), los estudiados son el factor de crecimiento de diferenciación 9 (GDF9), BMP15 y BMP6. Otro factor de crecimiento producido localmente, BMP6, también parece ser un regulador importante en la función de las células foliculares (Figura 1). En ovinos y bovinos el GDF9 se expresa en ovocitos de folículos primordiales y luego durante la foliculogénesis, mientras que BMP15 se expresa a partir de folículos primarios (19).

Los GDF9 y BMP15 son esenciales para la progresión de las primeras etapas de la foliculogénesis ovina. En las ovejas genéticamente deficientes en GDF9 o BMP15 el crecimiento folicular es detenido en la etapa primaria de la foliculogénesis (20). Se sugiere que GDF9 y / o BMP15 secretados por ovocitos en folículos primarios pueden promover directamente la proliferación de células de la granulosa. Alternativamente, GDF9 / BMP15 puede contrarrestar las acciones de un factor inhibidor del crecimiento folicular (19). Los factores secretados por ovocitos BMP-6 y BMP-15, son responsables de la baja incidencia

de apoptosis dentro de las células del cúmulo, a través del establecimiento de una red paracrina de los factores de crecimiento BMP y sus proteínas de unión [Figura 1] (18).

En bovinos, el receptor ácido ribonucleico mensajero (mARN) de FSH se expresa en las células de la granulosa de todos los folículos en crecimiento, comenzando en algunos folículos con una sola capa de células de la granulosa. El nivel de expresión del receptor mARN de FSH en las células de la granulosa de folículos antrales de 0.5 a 14 mm de diámetro no varía significativamente con el tamaño folicular. La expresión del receptor mARN de LH se observa en las células de la teca interna del folículo poco después de la formación antral. En las células de la granulosa, el receptor mARN de LH se expresa solo en folículos sanos mayores a 9 mm de diámetro. Los folículos dominantes sanos recogidos en los días 4, 6 y 8 del ciclo expresan el receptor mARN de LH en las células de la granulosa (21).

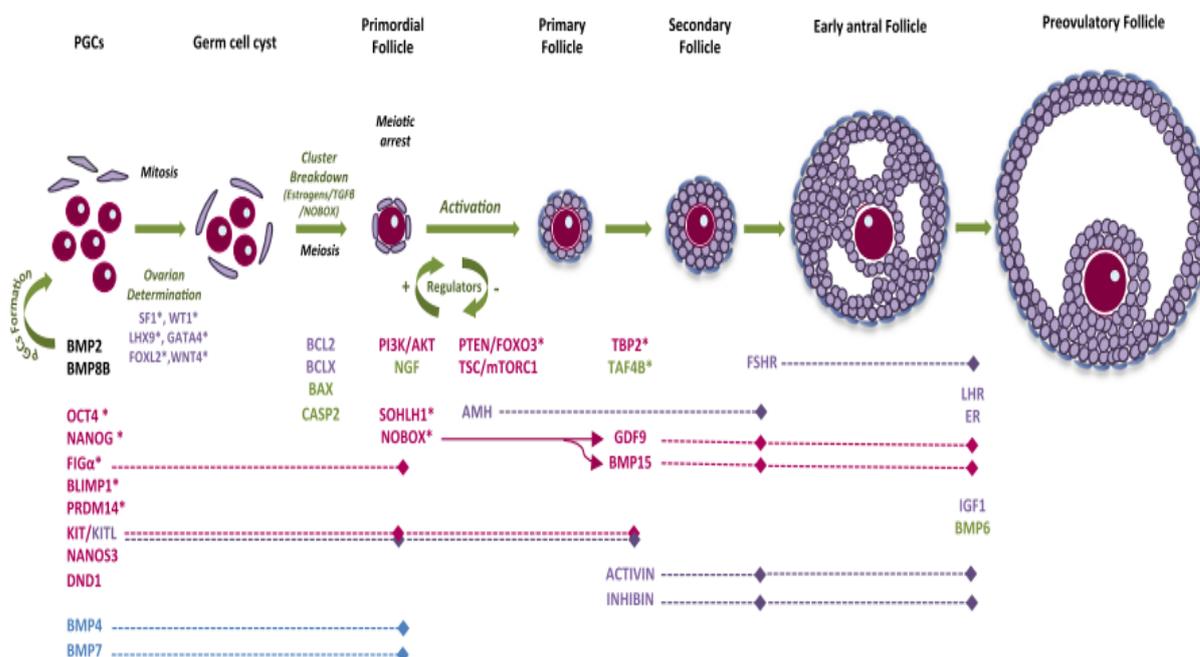


Figura 1. Esquema representativo de los factores implicados en la formación de células germinales primordiales, la ovogénesis y la foliculogénesis. Los factores ováricos producidos por la teca / células estromales (en azul), células somáticas / granulosa (en morado), células germinales (en rojo) o en células germinales y granulosa (en verde). Los factores de transcripción (*). Las proteínas del ectodermo embrionario [en negro] (7).

1.1.3. Maduración de ovocitos

La maduración de ovocitos es el evento fisiológico que precede y es necesario para la fertilización exitosa y el desarrollo embrionario (22). La maduración de los ovocitos comienza antes del nacimiento y continúa durante la foliculogénesis, es un proceso prolongado y complejo durante el cual los ovocitos alcanzan la capacidad de desarrollo. Solo un pequeño número de estas células tendrán la posibilidad de desarrollarse para una probable fertilización (23). El ovocito es una célula única, no solo en estructura y función, sino es la única célula en hembras que se somete a la meiosis, una división de reducción en el número de cromosomas de un estado diploide a uno haploide (24).

El proceso de maduración de ovocitos, involucra la coordinación de eventos nucleares y citoplasmáticos integrados, independientes: el núcleo se somete a la descomposición de las vesículas germinales, la reanudación de la meiosis y la finalización de la primera división meiótica (25). La reanudación de la meiosis y la progresión, a través de la maduración, dan como resultado el arresto en la metafase II y los procesos citoplásmicos acompañantes necesarios para la fertilización exitosa y el desarrollo embrionario temprano (22, 24).

La maduración de los ovocitos ocurre en los folículos preovulatorios, después del aumento preovulatorio de LH, seguido del desarrollo final del folículo preovulatorio. Incluye la finalización de dos eventos celulares; maduración nuclear (reanudación de la meiosis desde la etapa de la vesícula germinal hasta la formación de la segunda placa metafásica) y la maduración citoplásmica [cambios moleculares y estructurales que proporcionan al ovocito maduro la capacidad de fertilización y desarrollo embrionario temprano] (12). Por tanto, la maduración de ovocitos comprende dos procesos interrelacionados: maduración nuclear y citoplásmica, que se adquiere durante el crecimiento (7, 24).

1.1.3.1. Maduración nuclear

Los ovocitos de los mamíferos experimentan la primera progresión meiótica durante el desarrollo embrionario, en el momento del nacimiento, se detienen en la etapa diplotene de la profase I, donde al núcleo se le conoce como vesícula germinal estando el ovocito inmaduro (26). La

meiosis se inicia con la profase, una fase compleja que es subdividido en cinco etapas: leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diakinesis. Posteriormente, los ovocitos llegan a la etapa diploteno de la profase I, donde permanece por largo tiempo, estado conocido como dictioteno (7). Por tanto, la maduración de los ovocitos es un proceso complejo que involucra mucho más que el desarrollo nuclear, los cambios nucleares que ocurren entre la etapa de la vesícula germinal y la metafase II representan solo los pasos finales y los más fáciles de observar por microscopía (27).

Las células circundantes al ovocito proporcionan un entorno inhibitorio, su eliminación resulta en la reanudación de la meiosis (26, 28). Esta transición ocurre en presencia de estímulos, como un aumento de gonadotropina, principalmente LH (29). Durante cada ciclo reproductivo, la oleada preovulatoria de LH desencadena la reanudación de la meiosis y su progresión a la metafase II, un proceso comúnmente denominado maduración de los ovocitos (26). Tras la reanudación de la meiosis I, se produce el desmontaje organizado de la envoltura nuclear (vesícula germinal) denominada rotura de la vesícula germinal, seguida de la condensación cromosómica, la formación del huso y la extrusión del primer cuerpo polar. A partir de entonces, el ovocito entra en la meiosis II que da como resultado el arresto en la metafase II hasta la fecundación (22, 26).

La maduración meiótica de ovocitos se describe en la Figura 2: Dentro del folículo, los ovocitos permanecen detenidos en la profase I y se caracterizan por una vesícula germinal (VG) en la que los cromosomas (rojo) permanecen descondensadas. Al ovocito arrestado en profase I se conoce como ovocito primario. Un aumento preovulatorio de LH bajo condiciones fisiológicas o la liberación mecánica del ovocito del folículo seguido del cultivo *in vitro* causa la descomposición del GV (GVBD); los cromosomas comienzan a condensarse (rojo) y las fibras del huso aparecen (verde). Posteriormente, los cromosomas (rojo) se condensan y se alinean en la placa metafásica del eje bipolar (verde) cuando el ovocito alcanza la metafase I. La meiosis I se completa mediante la extrusión de un cuerpo polar que contiene un conjunto de cromosomas. El segundo

conjunto de cromosomas se retiene en el ovocito, que se conoce como ovocito secundario (o un huevo). El ovocito maduro permanece detenido en la metafase II hasta la fertilización (30).

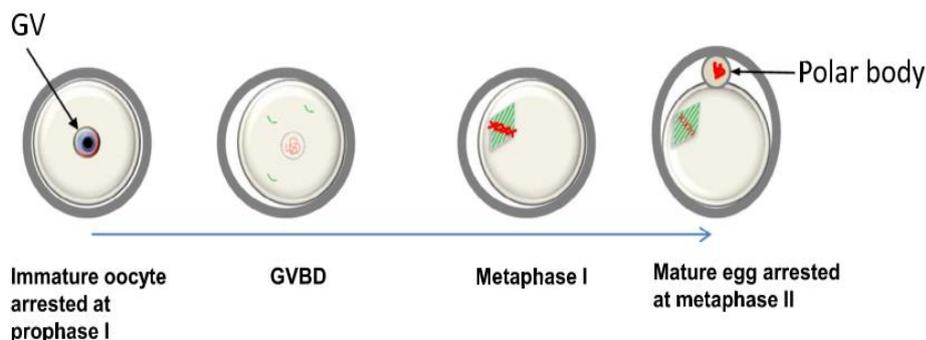


Figura 2. Representación esquemática del proceso de maduración meiótica de ovocitos de mamíferos. VG: Vesícula germinal; GVBD: Vesícula germinal rota (30).

El control de la maduración de los ovocitos implica una interacción compleja entre los ovocitos y las membranas extracelulares y el medio ambiente, con la participación de numerosas vías metabólicas. La reanudación de la maduración dinámica se basa en dos mecanismos diferentes: una estimulación positiva y la eliminación de una señal inhibitoria. El primero implica la producción de un ligando que actúa sobre el ovocito en la etapa de vesícula germinal induciendo la ruptura de esta vesícula (31).

La detención y reanudación meiótica de los ovocitos se describe en la Figura 3. La detención meiótica en los folículos en crecimiento se mantiene gracias a los niveles elevados de cAMP a través de la activación de proteína quinasa A (PKA), que fosforila e inhibe el factor promotor de la maduración. La reanudación meiótica en ovocitos completamente desarrollados se ve potenciada por el cierre de uniones Gap a través de aumento de LH y disminuyen los niveles de cAMP incrementando la inactivación de PKA. De manera inversa, la ruta de fosfolipasa C, se activa en ovocitos maduros en respuesta a prostaglandina E2 mediante el desencadenamiento posterior de PKC, proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y factor promotor de la maduración (MPF), lo que

conduce a la reanudación meiótica. La FSH o ácido araquidónico regulan la proliferación de células somáticas y la detención meiótica de ovocitos en el folículo inmaduro a través de las vías de cAMP / PKA; por otro lado, la reanudación meiótica del ovocito y la ovulación se activan tanto por LH como por ácido araquidónico a través de las rutas de cAMP / PKC; las prostaglandinas se producen rutinariamente en ambas vías, que promueven diferentes actividades celulares en ovocitos inmaduros y maduros debido a su interacción distinta con los receptores prostaglandina E (28).

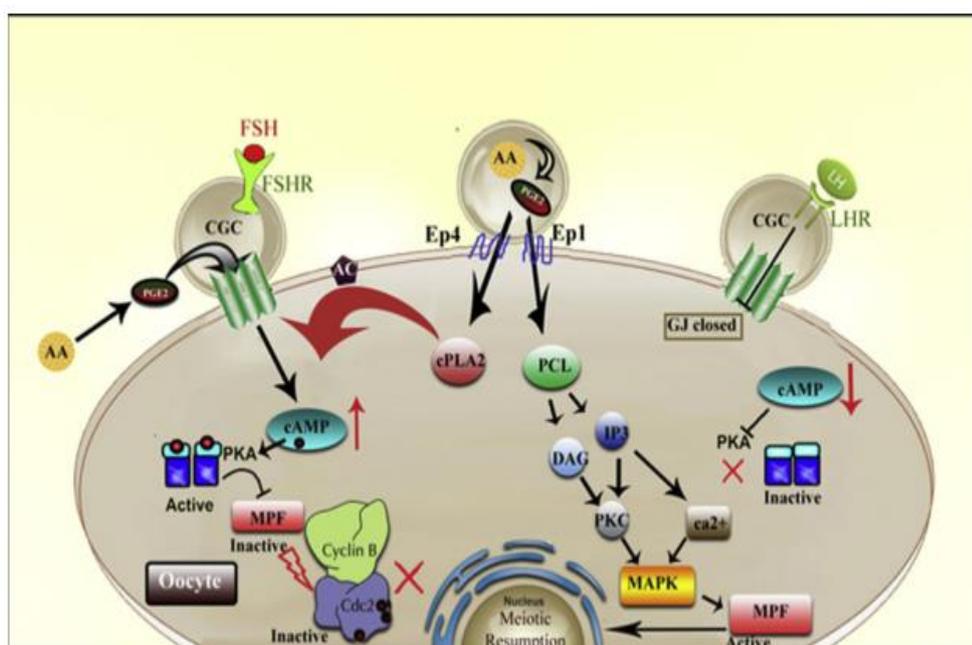


Figura 3. Efecto de dos vías de liberación distintas de ácido araquidónico (AA) sobre el arresto y reanudación meiótica de ovocitos. AA: ácido araquidónico; PGE2: prostaglandina E2; EP1 / 4: receptor de prostaglandina 1/4; CGC: célula granulosa cúmulo; LH: hormona luteinizante; LHR: receptor de LH; FSH: hormona folículo estimulante; FSHR: receptor de FSH; cPLA2: fosfolipasa citosólica A2; PLC: fosfolipasa C; AC: Adenilato ciclasa; cAMP: monofosfato de adenosina cíclico; PKA: proteína quinasa A; DAG: Diacilglicerol; IP3: inositol trifosfato; PKC: proteína quinasa C; MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno; MPF: factor promotor de la maduración; GJ: unión Gap (28).

La maduración de ovocitos inducida por LH se describe en la Figura 4. El panel superior muestra el mantenimiento del arresto meiótico del ovocito antes de la oleada de LH. Los ovocitos se mantienen en arresto meiótico debido a los altos niveles intracelulares de cAMP. La interacción del CNP (Péptido natriurético tipo C) producido por las células murales y su receptor NPR2 (receptor peptídico natriurético 2), expresado en las células del cúmulo (y reguladas positivamente por OSF [factores secretores del ovocito] y E2) inducen la conversión de GTP (guanósín trifosfato) en cGMP (monofosfato de guanósina cíclico), que luego se transfiere a los ovocitos a través de uniones Gap. El cGMP previene la activación de PDE3 (fosfodiesterasa 3) dentro del ovocito y el cAMP se mantiene en niveles elevados. Después de la oleada de LH, la vía de señalización de PKA (proteína quinasa A) se activa e induce la producción de factores de tipo EGF (es decir, AREG / EREG [Ampiregulina/epirregulina]). Los factores tipo EGF, a su vez, activarán una cascada de eventos mediados por el EGFR (tanto en células murales como en células del cúmulo). Como resultado, ERK1 / 2 (quinasa reguladora de señal extracelular 1 / 2) inducirá otros eventos principales: 1) la regulación positiva de las transcripciones responsables de la expansión del cúmulo *Has2* (ácido hialurónico sintasa 2), *Tnfaip* (Proteína inducida por TNF alfa), *Ptk3* (pentraxina 3) y *Ptgs2* [prostaglandina-endoperóxido sintasa] (que también están reguladas positivamente por los CEEF [factores que permiten la expansión del cúmulo] derivados del ovocito); 2) producción de PTGS2, que mejora la respuesta a los estímulos de LH mediante la producción de PGE2 e induciendo la producción de más factores de tipo EGF y la activación de la cascada posterior y, 3) el cierre de las uniones gap, que evita la transferencia de cGMP en el ovocito. En paralelo, los niveles de CNP y NPR2 disminuyen y también contribuyen a la baja producción de cGMP, dentro del ovocito, algunas transcripciones importantes para la transición del GV al estadio metafase II se traducen activamente (7).

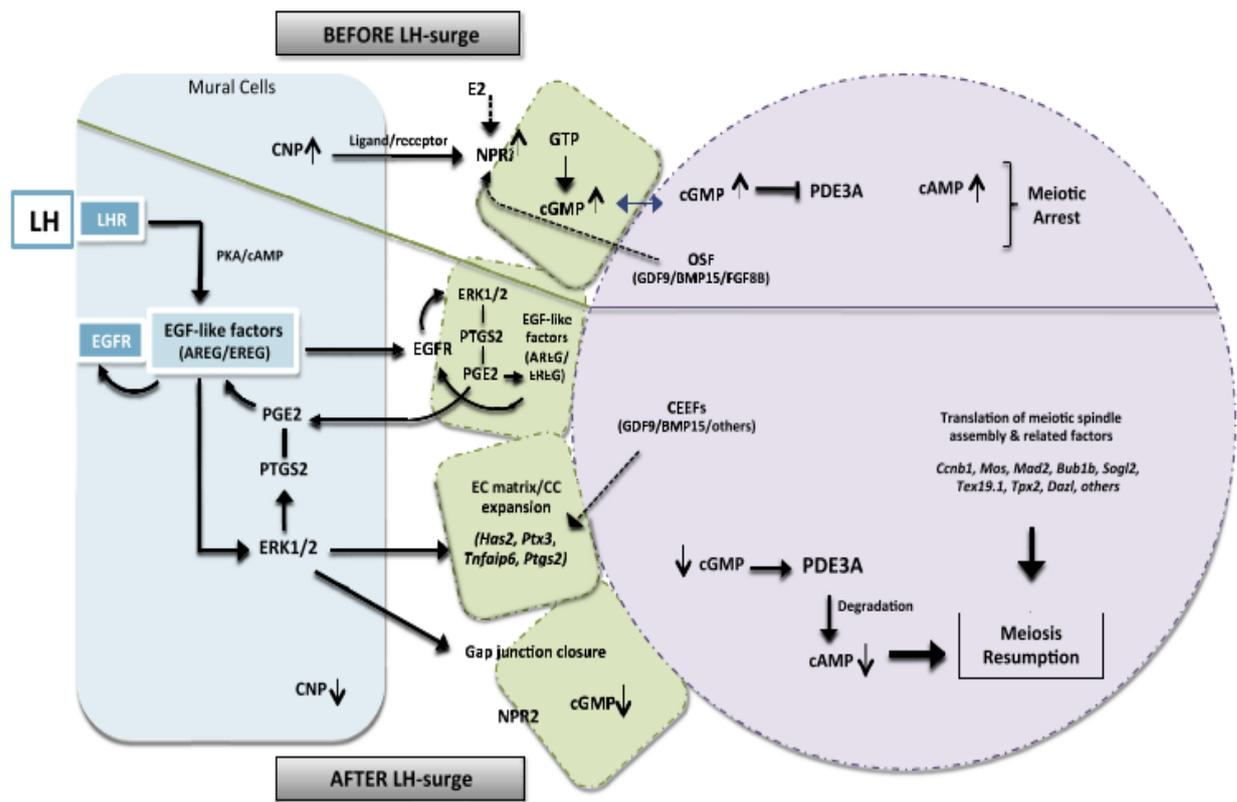


Figura 4. Representación esquemática de la maduración de ovocitos inducida por LH (7).

En la maduración del ovocito también se considera la competencia meiótica, que es el proceso más visible y ampliamente estudiado en los ovocitos de mamíferos. Se refiere a la maduración nuclear, que describe la progresión del núcleo de ovocitos desde la etapa de vesícula germinal, mediante la ruptura de dicha vesícula (reanudación de la meiosis), la asociación de los cromosomas homólogos con la primera extrusión del cuerpo polar, hasta la segunda detención meiótica en metafase II (9). La competencia meiótica de los ovocitos se adquiere en etapas más tempranas, cuando los ovocitos todavía son incapaces de desarrollarse, los ovocitos se mantienen en la etapa de vesícula germinal hasta alcanzar su maduración completa. La comunicación entre el ovocito y las células granulosas que la rodean es vital, tanto para el desarrollo de ovocitos como para la diferenciación de las células de la granulosa. Los ovocitos dependen de células cúmulo diferenciadas, que les proporcionan los nutrientes y las señales reguladoras necesarias para promover la

maduración nuclear y citoplásmica de los ovocitos, en consecuencia, la adquisición de competencia meiótica (7).

1.1.3.2. Maduración citoplasmática

La maduración citoplasmática se refiere a la preparación del citoplasma de los ovocitos para la fertilización y el desarrollo embrionario. Durante este proceso, las moléculas del ARN, las proteínas y los genes se concentran en el citoplasma para regular la meiosis y el desarrollo de los ovocitos. Los eventos que comprenden la maduración del citoplasma de los ovocitos están menos definidos que la maduración nuclear, pero igualmente importantes. La producción de gránulos corticales de los complejos de Golgi y su posterior proliferación y migración hacia el oolema es un paso crítico de la maduración de ovocitos (24).

La maduración citoplasmática requiere la reubicación de orgánulos citoplásmicos y el establecimiento de la polaridad de los ovocitos, con un aumento en el número de mitocondrias y ribosomas. Hay alteraciones en los sistemas de transporte de membrana, y el aparato de Golgi en desarrollo, se expande y migra hacia la periferie. Los orgánulos aparecen en el citoplasma que reflejan el almacenamiento y la exportación de materiales: vesículas que se unen a la membrana, cuerpos multivesiculares y cristalinos, gotas de grasa y gránulos de glucógeno (25). El marcador más utilizado para la maduración citoplásmica es la evaluación del movimiento de los gránulos corticales hacia la periferie del ovocito; esta evaluación puede llevarse a cabo utilizando microscopía láser confocal y diferentes fluorocromos (32).

1.1.4 Clasificación de ovocitos

En la evaluación de ovocitos Hawk y Wall (33) clasifica en tres tipos los ovocitos; categoría A: calidad buena; B: Calidad intermedia; C: Rechazados, se describe en la Tabla 1.

Según De Loos *et al.* (34), los ovocitos se clasifican o categorizan según el número de capas de células de cúmulos y el aspecto del citoplasma en cuatro categorías:

Categoría 1.- complejo ovocito cúmulos con ≥ 5 capas de células del cúmulos compactos y citoplasma homogéneo; categoría 2.- complejo ovocito cúmulos con 2 a 4 capas compactas de células del cúmulo, y citoplasma homogéneo; categoría 3.- complejo ovocito cúmulos ≤ 1 capa de células de granulosa o parcialmente desnudado, y citoplasma vacuolado; categoría 4.- ovocitos desnudados y citoplasma granular.

Tabla 1

Clasificación de ovocitos según características morfológicas previa a la maduración.

Tipo de ovocito	Características del cumulo	Características del ovocito
Calidad buena	Compacto, con varias capas de células. Con Granulosa adherida es permisible si el citoplasma se ve claramente.	Homogéneo, denso y finamente granulado.
Calidad intermedia – marginal	Grueso, usualmente con granulosa adherida, pero el citoplasma no se ve claramente; cumulo compacto, con pocas a varias capas, cubriendo al menos la mitad de la zona pelúcida	Rango desde homogéneo denso y finamente granulado a granulado de tamaño moderado.
Rechazados	Parcial o completamente expandido con cumulo disperso, falta de células con presencia de material extracelular, cumulo descolorido (café claro o muy oscuro); corona radiata sin cumulo; ovocitos desnudos	Granulado grueso o con mezcla de áreas muy claras o muy oscuras; citoplasma descolorido (café claro u oscuro); ovocitos deformes.

Fuente: (33).

1.1.5. Maduración *in vitro* del ovocito

La maduración *in vitro* es un método, donde los ovocitos inmaduros se recuperan de los folículos antrales, luego se realiza la maduración en el laboratorio (23). La maduración *in vitro* se realiza rutinariamente para producción de embriones *in vitro* en especies domésticas, especialmente en el ganado (22). La maduración de los ovocitos implica varios procesos. Los ovocitos de buena calidad, seleccionados en función de su aspecto morfológico, se maduran durante 24 h (dependiendo de la especie), convencionalmente en medio de cultivo tisular 199 o un medio similar, suplementado con gonadotropinas y / o factores de

crecimiento en una atmósfera de aire con 5% de CO₂. El primer signo morfológico que la maduración ha ocurrido, es la expansión de las células del cúmulo. La aparición del primer cuerpo polar extruido en el espacio perivitelino, indica que el ovocito está en la etapa de metafase II (9).

Los ovocitos de los folículos antrales reanudan espontáneamente la meiosis si se expulsan del folículo, por tanto, las señales de las células de la granulosa son importantes (8). Los ovocitos de los mamíferos adquieren una serie de competencias durante el desarrollo folicular, que desempeñan papeles críticos en la fertilización y el posterior desarrollo embrionario temprano. Los primeros estudios han demostrado que la maduración nuclear puede ocurrir espontáneamente después del cultivo *in vitro* de ovocitos inmaduros. Sin embargo, la capacidad del desarrollo después de la fertilización de estos ovocitos es cuestionable. La maduración de los ovocitos *in vitro* se ve extremadamente afectada por las condiciones de cultivo (35).

1.1.5.1. Tiempo de maduración *in vitro* del ovocito

La duración de maduración *in vitro* de ovocito, en alpacas fueron reportadas desde 24 h (6); 26 h (36); 30, 34 y 38 h (37); 32 h (38); 38 a 42 h (39); hasta 42 h (40). Luego de varios estudios Huanca *et al.* (39) sugieren que las alpacas requieren alrededor de 38 h de maduración *in vitro*.

En llamas el tiempo de maduración *in vitro* de ovocitos evaluados fueron: 30 h (41, 42); (43), 28, 30 y 36 h (44); 36 y 42 h (45); en camellos 40 a 42 h (46). En bovinos la maduración *in vitro* es alrededor de 24 h (47).

1.1.5.2. Condiciones de cultivo en la maduración del ovocito

El sistema de producción *in vitro*, comparados con el sistema *in vivo*, las condiciones *in vitro* son estáticas aparte de los cambios intrínsecos durante el período de cultivo inducidos por los mismos ovocitos / embriones y las células somáticas acompañantes. Está documentado que los ovocitos y embriones, *in vitro*, se ven afectados por condiciones físicas específicas del entorno como por otros componentes indefinidos. Los parámetros

importantes son la osmolaridad y la composición iónica, la temperatura, el pH, la tensión de CO_2 y O_2 así como el volumen de cultivo (48). La mayor parte de los protocolos de cultivos de ovocitos y embriones utilizan una temperatura alrededor de $38.5\text{ }^\circ\text{C}$; con una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de humedad.

Las condiciones de maduración de ovocitos *in vitro* en camélidos se rigen a los protocolos de otras especies. Generalmente utilizan $39\text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura, 5% de CO_2 , en alpacas (39, 40, 49, 50), , y en llamas (42, 44); Sin embargo, otros utilizan $38.5\text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura y 5% de CO_2 (36, 38), incluso 6% de CO_2 con tensión de 5% de oxígeno con máxima humedad para maduración de ovocitos de alpacas (6).

1.1.5.3. Medios de maduración *in vitro* de ovocitos

Los medios de cultivo empleados en maduración *in vitro* del ganado pueden dividirse en general en simples y complejos. Los medios simples suelen ser sistemas con bicarbonato tamponado que contienen solución salina fisiológica básica con la adición de piruvato, lactato y glucosa; las principales diferencias entre las diversas formas de medios simples radican en las diferencias en su concentración de iones y en los niveles de las fuentes de energía. Los medios generalmente se complementan con suero o albúmina con trazas de antibióticos (penicilina, estreptomycin, gentamicina). Los medios complejos contienen, además de los componentes básicos de medios simples, aminoácidos, vitaminas, purinas y otras sustancias, principalmente en las concentraciones encontradas en el suero; el nitrógeno fijado está presente como aminoácidos libres. Varios experimentos se realizaron evaluando los diferentes componentes de los sistemas de maduración *in vitro* de bovinos (suero de diversas fuentes o albúmina sérica bovina, fluido folicular, gonadotropinas, esteroides, factor de crecimiento y citoquinas). También consideraron el manejo de factores como el pH, osmolaridad, temperatura, fase gaseosa, humedad y el momento de la maduración. El progreso a lo largo de los años fue el uso desde medios complejos hasta medios definidos químicamente (51).

Aunque, existen numerosos datos de estudios en animales, la justificación actual para elegir un medio específico para maduración *in vitro* de ovocitos inmaduros, parece derivarse en gran parte de la adaptación de métodos desarrollados a partir del cultivo de otros tipos de células (35). Los mecanismos por los cuales los factores exógenos añadidos durante la maduración *in vitro*, mejoran la calidad de los ovocitos, aún no están claros (52).

El medio de cultivo tisular 199 (TCM 199), es un medio de cultivo complejo, tamponado con bicarbonato o ácido 2- (4- [2-hidroxietil] piperazin-1-il) etanosulfónico (HEPES) y suplementado con diversos sueros, gonadotropinas, hormonas esteroideas (17β - estradiol), es el medio de cultivo más utilizado para el estudio de maduración de ovocitos en bovinos; está establecido que la presencia en el medio de células somáticas foliculares puede influir en la competencia posterior del ovocito. El hecho de que componentes como el suero contengan toda una gama de aminoácidos, proteínas, factores de crecimiento, hormonas y otras sustancias activas dificultó conocer en qué medida responde el ovocito (51).

El sistema de amortiguación empleado en los medios de maduración dependerá de si el medio está expuesto al aire o a una atmósfera enriquecida con CO_2 . La ventaja de los medios tamponados con HEPES o fosfato para el trabajo a corto plazo con ovocitos y embriones es que no requieren una fase de gas controlada por CO_2 para mantener un pH relativamente constante. Con respecto a la cuestión de la osmolaridad, el objetivo es tener el medio de maduración isotónico entre 270 y 285 mOsmol, que es considerado el rango óptimo. Entre otros factores importantes el agua debe ser desionizada y ultrafiltrada, preparado por ósmosis inversa; el sistema de cultivo de estático, que implica la maduración de ovocitos en microgotas (por ejemplo, 10 a 20 complejos cúmulo - ovocito en volúmenes de 50 a 100 mL). El sistema de microgotas bajo el aceite tiene varias ventajas, tales como la minimización de la evaporación del agua, la protección contra la contaminación por microorganismos, la atenuación de la temperatura y las fluctuaciones del

gas y la facilidad de examen durante el cultivo. El uso de pequeñas cantidades de penicilina (50 a 100 UI mL⁻¹) y estreptomycin (50 a 100 mg mL⁻¹). Temperatura de 38 a 39 °C, 5% de CO₂ y 20% de oxígeno (51).

Los ovocitos maduran en medios complejos. Medio de cultivo tisular 199 (M199 / TCM - 199) con sales de Earle, complementados con gonadotropinas, estradiol, piruvato, factores de crecimiento, albúmina sérica bovina, suero y otros (22, 48),. Además del TCM, hay otros medios como Ham's-F10, medio de Chang tamponado con bicarbonato o HEPES, complementado con diversos sueros, gonadotropinas y estradiol; que se utilizaron ampliamente en investigación de ovocitos madurados *in vitro* (35, 53),. Durante la maduración *in vitro*, la suplementación de GDF9 recombinante y BMP15 tienen efectos positivos sobre la calidad de los ovocitos bovinos en las primeras 9 h de maduración (18).

Ha sido una práctica común incluir macromoléculas de diversas fuentes en medios de cultivo de maduración *in vitro*; el suero bovino o albúmina sérica bovina se ha usado generalmente para ese propósito. La maduración del ovocito bovino es un fenómeno complejo que involucra tanto al núcleo como al citoplasma. El suero incluido en el medio ha sido demostrado por varios grupos para mejorar la maduración de los ovocitos y el posterior desarrollo del embrión. Se sabe que el suero contiene una amplia gama de componentes, que incluyen hormonas, factores de crecimiento, aminoácidos y proteínas de unión; también se reconoce como un posible riesgo de enfermedad, bajo ciertas condiciones, cuando está contaminado con virus. La albúmina sérica bovina (BSA), puede considerarse como un componente variable de un medio de maduración, ya que se ha reconocido durante algún tiempo que la preparación comercial puede ser químicamente impura. La BSA posiblemente tenga un efecto promotor del crecimiento, también puede tener un papel en la quelación de iones metálicos tóxicos o en la absorción de iones como Ca²⁺ o Fe²⁺ por parte del embrión en forma quelada. El suero bovino, en forma de suero de ternera fetal se ha utilizado como la principal fuente de proteína en los estudios maduración *in vitro* del ganado durante muchos años (51).

Dado que hay muchos medios diferentes disponibles para el cultivo de ovocitos, no siempre está claro qué medio es el más apropiado para una especie en particular. Considerando que el uso de un medio simple puede minimizar la confusión mediante la eliminación de componentes que podrían interferir con el fenómeno que se estudia. También podría generar complicaciones no anticipadas al omitir componentes específicos, como sustratos de energía, aminoácidos o macromoléculas disponibles para el ovocito y utilizados por él. Sin embargo, los medios más complejos pueden introducir involuntariamente componentes que causan efectos secundarios perjudiciales en la fisiología de los ovocitos. Los resultados del experimento, en camellos dromedarios, muestran que se puede lograr una mayor velocidad de maduración nuclear cuando los complejo cúmulo - ovocitos se cultivan en TCM en comparación con CR1 o CMRL [*Modified Connaught Medical Research Laboratory medium-1066*] (46).

Los medios que se utilizan en la maduración de ovocitos *in vitro* en camélidos son similares a los protocolos de otras especies. Generalmente en alpacas usan TCM - 199 complementado con 0.2 mM de piruvato de sodio, 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de hCG, 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de 17 β -estradiol, 10% de suero fetal bovino, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina (37, 39, 40); en otros casos suprimen el uso de hCG y reducen a 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina (36, 38); también usaron el medio de maduración químicamente definido (HCDM-M: *chemically defined oocyte handling media*), con suero fetal bovino inactivado con calor al 10%. FSH 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$; LH 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, factor de crecimiento epidérmico 50 ng mL^{-1} ; 17 β -estradiol 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y cisteamina 10 mM (6).

En la maduración *in vitro* de ovocitos de llamas utilizaron TCM con sales de Earle suplementados con 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH; 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de LH; 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de 17 β -estradiol; 25 mM de piruvato y 10% de suero de bovino (41); TCM con 25 mM de HEPES, 0.2 mM de piruvato de sodio, 0.02 unidades mL^{-1} de FSH, 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de 17 β -estradiol, 10% de suero fetal bovino, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina (45); TCM con 10 ng mL^{-1} de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de 17 β -estradiol, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH; 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de LH, 10 ng mL^{-1} de factor de crecimiento

insulinoide (IGF), 10% de suero fetal bovino, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina (43). En camellos dromedarios usaron TCM con 1.4 mg mL^{-1} de HEPES, 0.8 mg mL^{-1} de bicarbonato de sodio, 0.25 mg mL^{-1} de piruvato, 0.01 mg mL^{-1} de glutamina, 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de 17 β -estradiol, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH; 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de LH, 0.6 mg mL^{-1} de lactato de calcio, 10% de suero fetal bovino, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina; otros medios como medio CR1aa; medio-1066 CMRL, con 0.6 mg mL^{-1} de piruvato sódico, con 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH-b y LH-b, 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de estradiol y 10% de suero fetal bovino y 50 mg mL^{-1} de gentamicina (46).

1.1.5.3.1. Hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH)

Se ha empleado una amplia gama de concentraciones de FSH (0.05 a 20 mg mL^{-1}) y LH (0.5 a 100 mg mL^{-1}) en los estudios de maduración. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las hormonas proteicas son difíciles de comparar entre los estudios debido a los diversos grados de pureza de muchas de las preparaciones. Los estudios en muchos laboratorios han traído evidencia creciente de que los factores de crecimiento juegan un papel importante en el proceso de maduración (51).

En los protocolos de fertilización *in vitro* estimulados con gonadotropinas, estas se usan para inducir el desarrollo folicular múltiple y la maduración de los ovocitos *in vivo*. La FSH es necesaria para el crecimiento de folículos preovulatorios. La LH apoya el crecimiento folicular al proporcionar sustrato andrógeno para la aromatasa de células de la granulosa y también desencadena la reanudación de la maduración de los ovocitos (35). En la maduración *in vitro*, es muy probable que la suplementación de medios de maduración con FSH o LH se base en la participación presunta de estas hormonas en el proceso de maduración *in vivo* (12). Aunque, lo más probable es que los mecanismos de la maduración de ovocitos son diferentes entre *in vitro* e *in vivo*, porque la mayoría de los experimentos de

maduración *in vitro* se realizan con ovocitos de folículos pequeños y medianos (35).

Actualmente, en la mayoría de los protocolos de maduración *in vitro* se suplementan con FSH o LH o una combinación de ellas (35). La fertilización de ovocitos aumenta significativamente al utilizar medio de maduración con FSH (54). La maduración *in vitro* de ovocitos bovinos en presencia de LH dio como resultado un mayor desarrollo embrionario después de la fertilización *in vitro* (55). Se demostró que la administración conjunta de suplementos de la hormona folículo estimulante recombinante (rFSH) y una alta concentración de hormona luteinizante recombinante (rLH) a un medio de maduración *in vitro*, mejora el desarrollo embrionario de los ovocitos en humanos y bovinos (56). La FSH, no la LH, influye en la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos (12). Existe el mRNA para los FSHR en ovocitos bovinos, por tanto, los mecanismos de FSH y LH en la maduración de ovocitos *in vitro* deben ser verificados. Sin embargo, el efecto de las gonadotropinas para la maduración de los ovocitos y la posterior fertilización y el desarrollo temprano, siguen en controversia (35).

La FSH, en el proceso de la maduración del ovocito, *in vitro*, induce la expansión de las células de cúmulo en bovinos, a través de la síntesis de piruvato y ácido hialurónico. Esta mucificación sería dependiente de la adición de suero fetal bovino al medio (57). Por otra parte, la LH mejora las condiciones de maduración *in vitro* del ovocito, modificando el ambiente nutricional, aumenta la energía disponible para el ovocito; este efecto metabólico se debería al incremento de la glicólisis mediante la oxidación de la glucosa mitocondrial (55). Las gonadotropinas pituitarias y la comunicación local bidireccional entre el ovocito y las células del cúmulos adyacentes son fundamentales para la maduración nuclear y citoplásmica (22). Las concentraciones utilizadas en los protocolos de maduración *in vitro* varían en la mayoría de los estudios entre 1 a 10 pg mL⁻¹ para LH y FSH (12).

Los cambios dinámicos observados en la expresión de proteínas de los receptores de progesterona (P4) después de la maduración *in vitro* o en respuesta a la suplementación con LH, FSH o P4 sugieren un papel importante para P4 durante la maduración de los ovocitos bovinos (9). Durante la maduración, el ovocito experimenta varios cambios que lo preparan para ser ovulado y fertilizado. La eliminación del primer bloque, referido al bloque meiótico marca el inicio de la maduración, evento complejo donde varias moléculas están involucradas, un aumento de calcio juega un papel fundamental en la reiniciación de la meiosis. En este proceso, se libera calcio de las reservas intracelulares, se conoce menos sobre el papel del calcio externo que entra en la célula a través de los canales celulares de la membrana plasmática (31). En la Figura 5, se describe que en las células de cúmulos se ubicarían los receptores de FSH y LH, desde donde se liberarían los estrógenos, progesterona y otros factores que participarían estimulando al ovocito para la expresión de la respuesta génica que promoverían la maduración de ovocitos (35).

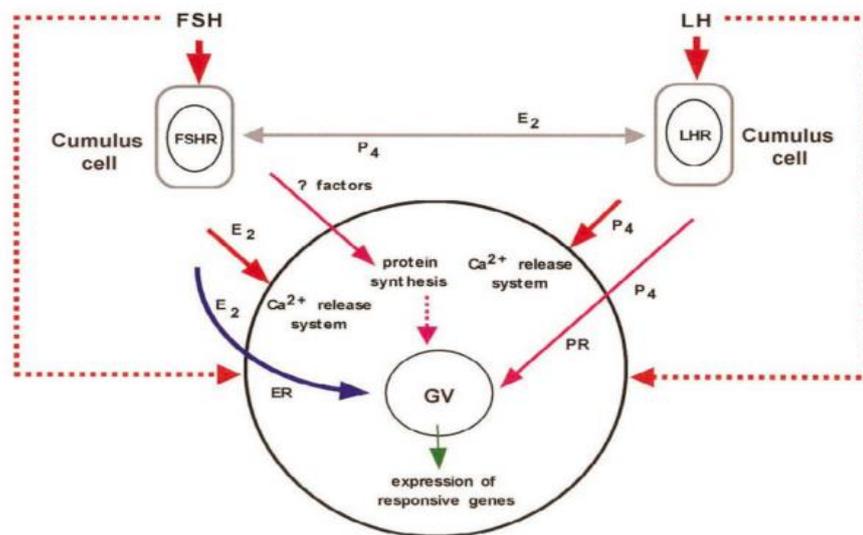


Figura 5. Modelo hipotético de posible participación de factores en la maduración de ovocitos humanos durante el cultivo *in vitro*. FSH : hormona folículo estimulante; LH : hormona luteinizante; FSHR : receptor de FSH; LHR: receptor de LH; GV : vesícula germinal; E₂ : estradiol; P₄ : progesterona; ER : receptor de estradiol; PR : receptor de progesterona (35).

Se requiere la concentración adecuada de FSH para modular los niveles intrafoliculares de mRNA de ligando kit (KL), que posteriormente controla el crecimiento de ovocitos. Las bajas concentraciones de FSH promueven el crecimiento de ovocitos al aumentar la expresión de KL-2, lo que reduce la proporción de KL-1 / KL-2. El aumento de la expresión de KL-1 / KL-2, estimulado por altas concentraciones de FSH, mejora el desarrollo del folículo pero deteriora el crecimiento de los ovocitos (24). En los folículos antrales bovinos menores que 8 mm en la pared de la granulosa poseen mRNA de FSH y ningún mRNA del receptor de LH, este último podría demostrarse únicamente en el tejido local (21). La suplementación en medios de cultivo con FSH también disminuyó la incidencia de la apoptosis de las células del cúmulo tanto en complejo cúmulo ovocito como en los ovocitoectomizados. También hubo efectos anti-apoptóticos de la FSH cuando se adicionaron BMP-15 o BMP-6 (18).

En alpacas, las hormonas comúnmente suplementadas en medios de maduración *in vitro* de ovocitos, son la FSH, LH, hCG, 17β -estradiol. Generalmente utilizan $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hCG, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de 17β -estradiol (37, 39, 40). Las dosis de algunas hormonas varían, en llamas usaron 0.02 unidades mL^{-1} de FSH (45); $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LH (43); $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LH (41); en camellos dromedarios $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH y LH (46). La diversidad en las preparaciones de gonadotropinas junto con las diferencias en la composición del medio de cultivo hace que sean difíciles de comparar los resultados de los diversos estudios; por lo que, la controversia continúa (12).

1.1.5.3.2. Gonadotropina coriónica equina (eCG)

La eCG es una hormona glicoproteína producida por las copas endometriales de la yegua gestante, se utiliza en manejo reproductivo de los animales (58). Las copas endometriales persisten durante 40 a 60 días de preñez, producen una

gonadotropina que se puede encontrar en la circulación sanguínea hasta aproximadamente 130 días de preñez en la yegua, el pico de la secreción de la eCG se da entre los 60 y 80 días en las yeguas preñadas existiendo una marcada variación entre individuos (58), (59). La tasa de desaparición de la hormona en el suero es muy baja durante el cuarto y quinto mes de gestación lo que no necesariamente indica el mantenimiento de una alta secreción activa, el aumento de la secreción de eCG puede correlacionarse con el desarrollo de una estructura endometrial especializada (60).

La eCG tiene una actividad similar a la LH, a pesar de la homología de aminoácidos, tiene una menor actividad que la LH equina (eLH), la característica más relevante es su pronunciada actividad como FSH y LH en otras especies; la eCG se une a receptores de FSH prácticamente en todas las especies mamíferas distintas a la equina, en las que se ha probado efectos biológicos parecidos a la FSH; tiene interacción similar y potente con receptores de LH, la base estructural de esta dualidad no se conoce pero puede estar relacionado con la región 90 y 110 de la cadena β , se cree que la eCG es expresada por las células trofoblásticas, hasta que las copas endometriales se degeneran, la función de eCG en la gestación equina no se conoce completamente, se cree que actúa como una LH para inducir la ovulación y / o complementa la luteinización de los folículos en la yegua y formar los cuerpos lúteos accesorios (58).

La eCG está compuesta de dos cadenas peptídicas de enlace no covalente, presenta una subunidad α de 96 aminoácidos, que es común a la encontrada en otras hormonas glicoproteicas, otra subunidad β de 149 aminoácidos idéntica a β LH de la yegua (58). La subunidad α tiene una secuencia aminoacídica igual que la eLH y muy parecida a la α hormona folículo estimulante equina, presenta una similitud entre el 70 a 90% con las cadenas α de las FSH de otras especies. La subunidad β como en todas las gonadotropinas es la responsable de la actividad hormonal

específica y es la más larga entre todas las glicoproteínas con 149 residuos de aminoácidos, su estructura primaria es exactamente igual que la β eLH y están codificadas por el mismo gen, que difiere solo en el grado de glicosilación, esto explica la similitud en sus efectos biológicos entre eLH y la eCG (61, 62).

El contenido de ácido siálico de la eCG es 10% mayor que otras glicoproteínas, éste es el responsable de su larga vida media; es importante los residuos de ácido siálico en el metabolismo y la actividad biológica de la eCG; la desialilación de la molécula de eCG aumenta el volumen de la distribución en el cuerpo, mientras la velocidad de eliminación no es afectada (62). La administración de eCG, 48 h antes de la maduración *in vitro*, proporciona actividad de FSH, , aumenta el porcentaje de embriones de 2 células y blastocitos (14).

La información es limitada sobre el uso de eCG, como suplemento en medio de maduración *in vitro* de ovocitos. En ovinos utilizaron 0, 5, 10, 20 o 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de eCG para la maduración de ovocitos a 38.5 °C en 5% de CO₂ en aire humidificado durante 26 h (63). En maduración de ovocitos bovinos utilizaron 250 UI de eCG y hCG mL^{-1} con hipotaurina/taurina (64). También utilizaron eCG en combinación con hCG en maduración *in vitro* de ovocitos porcinos, suplementado con 10 IU mL^{-1} eCG y 10 IU mL^{-1} hCG (65).

1.1.6. Evaluación de maduración de ovocitos

Después de la maduración de ovocitos *in vitro*, se realiza la evaluación generalmente observando el estado nuclear del ovocito, para ello se usa convencionalmente la tinción de orceína. En camélidos utilizaron la tinción de orceína acética, cuyo procedimiento es eliminar las células del cúmulo mediante la agitación en vórtex, fijar en etanol - ácido acético (3:1), por no menos de 36 h a 4 °C en refrigeración. Retirar los ovocitos de la solución de fijación y colocar entre 5 a 10 por portaobjeto cubierto con un cubreobjetos adherido con parafina-vaselina (1:1). Adicionar orceína (1% de orceína disuelta en ácido acético al 45%)

por un extremo del cubreobjetos para teñir los ovocitos, dejar secar por 20 min y evaluar en microscopio de contraste de fase a 400X, para observar el estado de maduración nuclear y se clasifican como vesícula germinal; metafase I, anafase-telofase; metafase II y degenerado (37, 49),. En otros casos después de la maduración, parte del complejo cúmulo - ovocito se eliminó del medio de maduración y se lavó con PBS suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1 mg mL⁻¹ de hialuronidasa y se fija en etanol: ácido acético, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (40). El lavado de ovocitos también se realiza con TL-HEPES suplementado con 210 unidades mL⁻¹ de hialuronidasa más 10% de suero fetal bovino (SFB) y gentamicina (42).

La evaluación de ovocitos se realiza según el estado de cromatina nuclear (Tabla 2), estos se clasifican como GV (ovocitos con vesícula germinal intacta), GVBD (ovocitos sin membrana nuclear definida o nucléolo), MI (ovocitos con placa metafásica y sin cuerpo polar), metafase II (ovocitos con placa metafásica y cuerpo polar)), anormales o degenerados (es decir, ovocitos con ooplasma fragmentado, sin membrana nuclear nítida o nucléolo, cromosomas dispersos en grupos dentro del ooplasma, o cromatina no reconocible en cualquier etapa de la meiosis) (44, 46). Se considera que un ovocito es inmaduro cuando se encuentra en cualquier etapa desde VG hasta la MI, mientras ovocito maduro se considera cuando presenta una placa en metafase y un cuerpo polar (metafase II) y degenerado cuando el citoplasma está fragmentada, vacuolizada o la cromatina no es reconocible en cualquier etapa de la primera división meiótica (41).

Otra forma de evaluar la maduración del ovocito es por visualización del primer cuerpo polar. Para ello se realiza la denudación de ovocitos mediante pipeteo o agitación con vórtex. La maduración nuclear se considera como la observación del primer cuerpo polar y se evalúa utilizando un estereomicroscopio o microscopio invertido (6, 42).

Tabla 2

Clasificación del estado nuclear del ovocito.

Categoría	Características del estado nuclear
Vesícula germinal (GV)	Ovocitos con una vesícula germinal intacta y con cromatina laxa.
Vesícula germinal rota (GVBD)	Ovocitos sin membrana nuclear definida o nucléolo.
Metafase I (MI)	Ovocitos con una placa metafásica y sin cuerpo polar.
Metafase II (MII)	Ovocitos con una placa metafásica y un cuerpo polar.
Degenerados (DG)	Ovocitos con ooplasma fragmentado, sin membrana nuclear nítida o nucléolo, cromosomas dispersos en grupos dentro del ooplasma, o cromatina no reconocible en cualquier etapa de la meiosis.

Fuente: (44).

1.1.7. Fertilización *in vitro*

1.1.7.1. Medios de fertilización

En el sistema para la fertilización *in vitro* del ganado, el medio empleado debe ser capaz de proporcionar al ovocito maduro y al espermatozoide capacitado un entorno en que la penetración de los espermatozoides pueda ocurrir fácilmente. El medio albúmina lactato piruvato de Tyrode (TALP), es una preparación de Tyrode modificada que contiene 25 mM de bicarbonato de sodio y albúmina de suero bovino (0.6%). El medio Tyrode / albúmina se modifica también con cantidades variables de fuentes de energía de lactato de sodio y piruvato de sodio. Las concentraciones óptimas de estas fuentes de energía parecen ser 10 mM de lactato y 1.0 mM de piruvato en presencia de 5.6 mM de glucosa; la osmolaridad se mantiene entre 285 a 295 mOsmol. Cuando se usa TALP como medio de fertilización, la BSA se utiliza como fuente de proteína. El medio fluido oviductal sintético modificado (mSOF), medio de fertilización definido

químicamente (Fert-CDM), son utilizados para la fertilización *in vitro* en algunos laboratorios como una alternativa al medio TALP (51).

En camélidos al parecer el medio Fert-TALP es el más utilizado. Este medio Fert-TALP, contiene componentes básicos: NaCl 114.0 mM, KCl 3.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM, NaH₂PO₄ 0.3 mM, lactato de sodio 10.0 mM, CaCl₂ 2.0 mM, MgCl₂ 0.5 mM, piruvato de sodio 0.25 mM, BSA libre de ácidos grasos 6 mg mL⁻¹ y sulfato de gentamicina 50 µg mL⁻¹ (41). En llamas, después de la maduración *in vitro*, los ovocitos de llamas fueron colocados en microgotas de 50 µL de Fert-Talp (45). También utilizaron en alpaca el medio de fecundación TL-stock (49).

1.1.7.2. Capacitación espermática

La capacitación espermática es la condición fisiológica que deben cumplir los espermatozoides para adquirir su capacidad fecundante; los mecanismos de capacitación son poco conocidos pero se sabe que provocan cambios bioquímicos y ultraestructurales que conducen a la eliminación de los componentes adheridos a la membrana del espermatozoide, cambio de la composición lipídica de la membrana espermática, aumento de la permeabilidad a los iones Ca²⁺, cambio en el pH interno y un incremento de la permeabilidad y del metabolismo celular (66). La capacitación espermática involucra cambios en la membrana plasmática del espermatozoides con pérdida, reorganización y activación de varias moléculas, lípidos, fosfolípidos; dichos cambios causan flujo de salida de colesterol, permeabilización de membrana, seguida de activación de señal bioquímica intraperitoneal y finalmente alcanza la reacción acrosómica (67, 68).

El único fenómeno observable al microscopio, como resultado de la capacitación, es un aumento del patrón de motilidad denominado hipermotilidad, como consecuencia de la redistribución de los componentes de la membrana durante la capacitación. Todo estos cambios conducen a la reacción acrosómica, cuya activación prematura es evitada por los mismos factores que regulan la capacitación (66). Posteriormente

la reacción acrosomal es un proceso excitotico irreversible que conduce a la liberación de enzimas hidrolíticas y permitiendo que los espermatozoides penetren en la zona pelúcida. Al inicio de la capacitación hay aumento de Ca^{2+} , bicarbonato (HCO_3) y peróxido de hidrógeno intracelular, que activan colectivamente la producción de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) por adenilato ciclasa, que a su vez activa la proteína quinasa A para fosforilar ciertas proteínas (67).

Los mecanismos propuestos para que el espermatozoide alcance la capacitación y la reacción acrosómica, implican cambios que experimentan los espermatozoides durante la capacitación *in vitro*; no se conoce si los mecanismos que están involucrados *in vitro* son los mismos que ocurren *in vivo*. Actualmente, se cree que las principales fases que atraviesan los espermatozoides durante la capacitación e inducción de la reacción acrosómica son: Adquisición por parte del espermatozoide, aumento de permeabilidad al calcio, modificación de la estructura de la membrana, activación de la adenil ciclasa, conversión de proacrosina en acrosina activa (69).

Cuando los espermatozoides se incuban *in vitro* en un medio capacitante, el colesterol del espermatozoide disminuye; es por ello la mayoría de los medios de incubación contienen albúmina sérica, que se une al colesterol eficientemente, reduciendo la afluencia del colesterol y por lo tanto aumentando la pérdida neta de colesterol (70). Sin embargo, la capacitación inducida por heparina no requiere BSA, pero necesita BSA para que los espermatozoides bovinos capacitados experimenten una reacción acrosomal, ya sea en respuesta a la lisofosfatidilcolina o zona intacta de ovocitos. La heparina probablemente conduce al colesterol de los espermatozoides a través de la interacción con proteína de plasma seminal, por lo tanto, no es necesario un potencial aceptor de colesterol como BSA para eliminar el colesterol de los espermatozoides y modular la dinámica de la membrana plasmática. El papel exacto de BSA durante la reacción acrosómica sigue sin estar claro (71).

Los agentes capacitantes de uso común son Penicilamina, Hipotaurina y Epinefrina (PHE). La presencia de heparina y una mezcla de solución de penicilamina, hipotaurina y epinefrina en los medios de fertilización *in vitro* parece ser un requisito previo cuando los espermatozoides bovinos se capacitan *in vitro* para estimular la motilidad espermática y la reacción acrosomal. La penetración de ovocitos y las tasas normales de formación pronuclear, así como el porcentaje de cigotos que presentan más de dos pronúcleos, fue mayor en presencia de heparina y PHE. La suplementación en los medios de fertilización *in vitro* con heparina y solución de PHE afecta la calidad de espermatozoides, es importante en la capacitación de los espermatozoides, mejorando la formación pronuclear y el desarrollo embrionario temprano (72). La epinefrina en niveles fisiológicos estimula la reacción acrosómica, en presencia de penicilamina, que actúa como quelante que posiblemente proteja contra metales pesados (73).

En la capacitación de espermatozoides de camélidos generalmente utilizan la técnica de gradiente de Percoll y Swing up. Como agente capacitante usan 2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina, 250 mM de epinefrina. Los espermatozoides de alpaca fueron separados mediante gradiente discontinua de Percoll de 22.5% : 45%, luego se centrifugó por 10 min a 600 g y posteriormente por 5 min a 300 g. El pellet obtenido fue reconstituido con 30 μ L de TL-Stock. Finalmente, se colocaron 2 μ L de suspensión de espermatozoides en cada microgota que contiene ovocitos maduros y se añadieron 2 μ L de heparina al 2% y 2 μ L de PHE [2 mM Penicilamina, 1 mM Hipotaurina y 250 mM Epinefrina] (37, 40, 49).

La suspensión de espermatozoides de llamas, se lavó dos veces con 2 mL de solución Sperm-TALP y se centrifugó a 300 g durante 5 min cada vez. Para separar los espermatozoides vivos de muertos, aproximadamente 1 mL de la suspensión del espermatozoide se colocó en gradiente de densidad discontinua de Percoll (2 mL 90% y 2 mL de solución al 45%), luego fue centrifugado a 1000 G durante 30 min. El sedimento de espermatozoides se resuspendió en una solución de Tyrode modificada Fert-TALP; a una concentración de 50 a 75 x 10⁶ espermatozoides mL⁻¹ (41). Los espermatozoides de alpacas con una motilidad progresiva $\geq 75\%$

se centrifugaron en un gradiente de Percoll discontinuo (1 mL de 45% y 1 mL de Percoll al 90%) durante 15 min a 700 g. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se suspendió con Sperm-TALP y se centrifugó a 350 g durante 6 min. Se eliminó el sobrenadante y se suspendió el pellet final con Fert-TALP suplementado con 6 mg mL⁻¹ de BSA libre de ácidos grasos y 10 µg mL⁻¹ de heparina hasta una concentración final de 1 x 10⁶ espermatozoides mL⁻¹ (36).

La capacitación de espermatozoides de alpacas mediante Swing – up sigue el siguiente procedimiento: los espermatozoides epididimarios diluidos con medio Sperm-TALP (1.5 mL) se lavó dos veces por centrifugación a 350 g durante 6 min. El sedimento final se resuspendió con 1 mL de Sperm-TALP y se colocaron 250 µL de esta suspensión en 1 mL de Sperm-TALP en tubos Eppendorf, y se incubaron a 38.5 ° C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%. Después de 1 h, se recogieron 800 µL de la fracción superior de cada tubo Eppendorf y se colocaron en 2 mL de Sperm-TALP en un tubo cónico de 15 mL y se centrifugaron dos veces a 1500 rpm durante 6 min. El sedimento final se suspendió con Fert-TALP complementado con 6 mg mL⁻¹ de BSA libre de ácidos grasos y 10 µg mL⁻¹ de heparina hasta la concentración final de 1 x 10⁶ espermatozoides mL⁻¹ (38).

1.1.7.3. Fecundación *in vitro*

La fertilización se define como el proceso de unión de dos gametos, óvulo y espermatozoide; cuando los óvulos y los espermatozoides de mamíferos entran en contacto en el oviducto femenino, se ponen en marcha una serie de eventos que pueden conducir a la fertilización y finalmente al desarrollo de nuevos individuos (74). La fecundación *in vitro*, consiste en la exposición de ovocitos maduros a espermatozoides capacitados de forma que se produce la fecundación fuera del tracto genital femenino, los gametos interaccionan entre sí, y tras la activación ovocitaria dan origen a un cigoto. En este proceso pueden utilizarse ovocitos que hayan madurado *in vivo* o *in vitro* (69, 74). La fertilización *in vitro* depende de la maduración y capacitación espermática. El tiempo de la interacción del

espermatozoide y el ovocito, medio utilizado, temperatura y concentración espermática son procesos importantes para la fertilización (75). Los gametos se co-incuban durante 24 h, después los presuntos cigotos se lavan y se cultivan en medios de cultivo hasta la etapa de blastocisto (9).

En el proceso de la fecundación *in vitro*, las células espermáticas, como ocurre en condiciones fisiológicas *in vivo*, deben alcanzar su capacidad fecundante. En consecuencia, deben ser sometidos a un proceso de preparación *in vitro* con el objeto de iniciar su capacitación y desencadenar la reacción acrosómica. Este fenómeno ocurre en el acrosoma, que se origina del aparato de Golgi de la espermátide. El acrosoma del espermatozoide cuenta con enzimas necesarias, activadas atraviesan las cubiertas celulares de los complejo cúmulo – ovocito (66). También en los gránulos corticales incluye se encuentran varias enzimas que se liberan en el espacio perivitelino y entran a la zona pelúcida en la fertilización, alterando las características físicas y químicas de la zona pelúcida (35).

Las aplicaciones más importantes de fertilización *in vitro* son: valoración de la capacidad fertilizada de los gametos, se puede comprobar la influencia de varios factores sobre la capacidad fertilizante de los gametos, manteniendo una condición constante sobre ambos (69). En términos de eficacia de producción de embriones *in vitro*, en el ganado vacuno, gran porcentaje de ovocitos inmaduros recuperados de folículos en etapas desconocidas del ciclo estral, experimentan maduración nuclear *in vitro*; alrededor de 80% se fertilizan después de la inseminación. Sólo el 30 a 40% de dichos ovocitos alcanzan la etapa de blastocito. El período más crítico ocurre durante la última parte del proceso del cultivo (etapas de 2 células a blastocisto), hecho que afecta el rendimiento de blastocistos (9).

En el proceso de fertilización *in vitro* se insemina al ovocito con espermatozoides epididimarios o de semen fresco o congelado. En alpacas, colocaron 2 μL de suspensión de espermatozoides en cada microgota que contenía ovocitos maduros y se añadieron 2 μL de heparina al 2% y 2 μL de PHE (PHE: 2 mM Penicilamina, 1 mM Hipotaurina y 250 mM

Epinefrina). Se realizó el co-cultivo en una estufa bajo condiciones de 39 °C con 5% de CO₂, 20% de O₂ y humedad relativa alta durante 18 h (39,49). Los ovocitos se fertilizaron *in vitro* utilizando espermatozoides epididimarios. Los gametos se coincubaron durante 18 h a 39 °C con 5% de CO₂ y alta humedad (40). Además del suplemento de PHE y heparina, se puede agregar al medio de fertilización metabisulfito de sodio (500 μM) y lactato de sodio (60%, 3 mM); se coloca 2 μL de suspensión de espermatozoides (2 a 3 x 10⁶ mL⁻¹ de espermatozoides) a la gota de fertilización de 48 μL (41). Transcurridos los tiempos de maduración *in vitro* (36 y 42 h), los ovocitos fueron colocados en microgotas de 50 μL de Fert-Talp con una concentración de 3 x 10⁶ de espermatozoides vivos mL⁻¹ (concentración final en la gota), luego colocados a la estufa de CO₂ (45).

1.1.8. Cultivo de embriones

El proceso que sigue a la fecundación es el cultivo de embriones, a medida que pasa el tiempo, los embriones alcanzan la etapa de blastocisto (6 a 7 días). El cultivo embrionario, es el periodo más largo dentro del proceso de producción de embriones *in vitro*, esta etapa es crítica porque se da el mayor porcentaje de pérdidas de embriones (76). Por tanto, el medio de cultivo es esencial. Actualmente el interés está orientado a dos aspectos básicos: 1) desarrollar medios de cultivo que respondan a las necesidades metabólicas de los embriones durante su desarrollo y 2) que eviten en su composición células somáticas y eliminen o disminuyan las fuentes proteicas (66).

Los estudios que se realizaron estuvieron orientados a las necesidades del embrión respecto a las funciones metabólicas y los requerimientos bioquímicos de los embriones durante su desarrollo hasta el estadio de blastocisto; también estudiaron las características bioquímicas del medio, las cuales variaron con el tiempo de cultivo, observando la existencia de una compleja interacción entre el metabolismo embrionario y los sustratos del medio (66). El uso de medios de cultivo definidos permiten la evaluación de las condiciones nutricionales necesarias para el desarrollo de embriones a etapas que son óptimas para su transferencia. El diseño de estos medios se basa en la dinámica fisiológica y metabólica del embrión y en la reducción del estrés intracelular (32).

1.1.8.1. Medios de cultivo de embriones

La composición de las diferentes formulaciones empleadas en el cultivo de los estadios embrionarios tempranos es relativamente simple. Básicamente se trata de una solución salina suplementada con una fuente de energía (piruvato, glucosa o lactosa) y con una fuente proteica (suero o albúmina sérica bovina); sin embargo, actualmente los medios más utilizados son el SOFaa, KSOMaa y el CR-1 (66).

Los componentes más importantes de los medios de cultivo, como parámetros biofísicos y elementos inorgánicos son: osmolaridad (280 ± 20 mOsm/Kg); pH, la mayoría de los embriones de mamíferos cultivados *in vitro* desarrollan en pH neutro o ligeramente alcalino (7.2 y 7.6); la atmósfera de gases más utilizada es 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂; bajos niveles de Na y altos niveles de K, magnesio, calcio, bicarbonato, sulfatos y fosfatos; agua purificada (18.3 megaohms-cm a 25 °C). Elementos orgánicos: hormonas, factores de crecimiento y compuestos macromoleculares, lactato, piruvato, glutamina y glucosa; aminoácidos esenciales y no esenciales ; suero bovino y/o albúmina sérica bovina; factores embriotróficos: factor crecimiento transformante (TGF) y factor de crecimiento similar a insulina 1 [IGF1] (76).

Los sistemas utilizados para el cultivo de embriones *in vitro* incluyen el cocultivo de diferentes tipos de células o el uso de medios de cultivo sintéticos definidos o semidefinidos. Los siguientes han sido utilizados en diferentes especies: células epiteliales de oviducto, células de granulosa, fluido oviductal sintético (SOF), medio 1 de Charles Rosenkrans (CR), medio de CR 2, medio de optimización de potasio simple (KSOM) y Dulbecco modificado medio de Eagle's (DMEM-F12); el uso de cocultivo con células somáticas también es una técnica aceptable para producir embriones (32).

En camélidos, varios medios de cultivo de embriones se utilizaron: SOF, KSOM, TCM, CR1aa y sus modificados. Los presuntos cigotos de alpaca se colocaron en microgotas de medio cultivo KSOM- AA, cultivados por 72 h, se evalúa el desarrollo embrionario temprano (2- 8 células), luego se

transfiere a medio de cultivo SOF-Stock, hasta 7 d (49). Los presuntos cigotos cultivados en medio KSOM fueron suplementado con 1 mM de glutamina, 0.3 mM de piruvato sódico, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina, ácido etilendiaminotetraacético, aminoácidos esenciales y no esenciales, BSA durante 3 días y cultivado en medio SOF durante 7 días (40). El cultivo *in vitro* de presuntos cigotos se realizó en medio KSOM-AA, suplementado con 10% de SFB, 2 mM de piruvato de sodio y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina, preparado en gotas de 30 μL (39). Los presuntos cigotos de alpaca se lavaron en TCM-199 suplementado con SFB al 10% y 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina y se cultivaron en una gota de 50 μL de TCM-199 que contenía células epiteliales oviductales bovinas a 38.5 °C en aire con 5% de CO₂ y alta humedad durante 8 días. El desarrollo de embriones se evaluó los días 2 y 7 de cultivo *in vitro* (36).

Los embriones de llama se cultivaron en gotas de 35 μL de medio CR1aa o medio G1.2TM a 38.5 °C y 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂ con atmósfera humidificada. El clivaje se evaluó el día 2 de cultivo (42). Luego de las 18 h del co cultivo de ovocito-espermatozoide, los supuestos cigotos fueron transferidos en microgotas de 50 μL de medio de cultivo de embriones SOF-IVC y mantenidos en una estufa de cultivo con 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa por un periodo de 8 días (45).

1.1.8.2. Morfología y calidad embrionaria

El desarrollo embrionario, comprende varias etapas. Pocas horas después de la fusión del núcleo el cigoto comienza a dividirse, esta división es mitótica y las nuevas células se denominan blastómeros. El desarrollo del embrión hasta los 8 días ocurre dentro de la zona pelúcida. En los primeros 6 días de desarrollo no se manifiesta aumento de tamaño, sólo el incremento del número de blastómeros. Entre 24 y 36 h después de la fertilización el cigoto de una célula se divide en 2 células ovales; 24 h más tarde el embrión cuenta con 4 células. La división de los blastómeros puede darse en forma asincrónica, razón por la cual es posible observar en estadios tempranos un número impar de células. Hasta el estadio de 8 células (d4) el cigoto es transportado a través del oviducto. Dentro del día

5 el cigoto continúa su desarrollo a 32 blastómeros siendo mórula temprana, su masa celular ocupa casi todo el espacio perivitelino. Mórula compacta, día 5 a 6, aproximadamente tiene 32 a 64 blastómeros, sus blastómeros están unidos y constituyen una masa compacta que ocupa sólo el 60 a 70% del espacio perivitelino. Blastocisto temprano, día 7 compuesto por 100 a 200 células, ocupa 70 a 80% del espacio perivitelino, es posible diferenciar el trofoblasto de la masa celular interna. Blastocisto, día 7 a 8, compuesto por 100 a 200 células, existe diferencia entre las células del trofoblasto, que constituyen una pared -que se adosa a la zona pelúcida- y la masa celular interna (o disco embrionario) más oscura. Blastocisto expandido, día 7 a 8, tiene más de 200 células, el diámetro aumenta considerablemente (1.2 a 1.5x), hay adelgazamiento de la zona pelúcida a 1/3 de su espesor original. La presión creciente del blastocisto en crecimiento provoca la ruptura de la zona pelúcida, a través de la cual comienza su protrusión. Blastocisto protruido, día 8 a 9, compuesto por 200 a 800 células, los embriones han abandonado la zona pelúcida, su forma puede ser esférica, con un blastocele definido o colapsado (66).

La evaluación del embrión comúnmente se realiza por su característica morfológica. Se realiza con microscopio estereoscópico a 50 a 100X. Existe el sistema de codificación estandarizado para usar la descripción de la etapa del desarrollo y la calidad del embrión se describen en el Manual de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (IETS). El código para la etapa de desarrollo es numérico, que va desde "1" (un ovocito no fertilizado o un embrión de 1 célula) hasta "9" (blastocisto expandido). Según el manual de la IETS se considera dos aspectos para la evaluación de embriones: la etapa de desarrollo y la calidad del embrión (77):

- Mórula (Etapa 3): una masa de al menos 16 células. Los blastómeros individuales son difíciles de discernir entre sí. La masa celular del embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.

- Mórula compacta (Etapa 4): Los blastómeros individuales se han fusionado, formando una masa compacta. La masa del embrión ocupa del 60 al 70% del espacio perivitelino.
- Blastocisto temprano (Etapa 5): un embrión que ha formado una cavidad o blastocele lleno de líquido y que da la apariencia general de un anillo de sello. El embrión ocupa del 70 al 80% del espacio perivitelino. Al principio de esta etapa, el embrión puede parecer de cuestionable calidad porque es difícil diferenciar la masa celular interna de las células de trofoblasto en este momento.
- Blastocisto (Etapa 6): es evidente la diferenciación pronunciada de la capa trofoblástica externa y de la masa celular interna más oscura y compacta. El blastocele es muy prominente, con el embrión ocupando la mayor parte del espacio perivitelino. La diferenciación visual entre el trofoblasto y la masa celular interna es posible en esta etapa de desarrollo.
- Blastocisto expandido (Etapa 7): el diámetro total del embrión aumenta drásticamente, con una concurrencia de adelgazamiento de la zona pelúcida aproximadamente un tercio de su espesor original.
- Blastocisto eclosionado (Etapa 8): Embriones recuperados en etapa de desarrollo, pueden eclosionar. Los blastocistos pueden ser esféricos con un blastocele definido o pueden colapsarse. La identificación de Los blastocistos eclosionados pueden ser difíciles a menos que se vuelvan a expandir cuando la apariencia del anillo de sello.

Los códigos para la calidad del embrión también son numéricos y se basan en la integridad morfológica de los embriones. Los códigos para la calidad del embrión varían de "1" a "4" de la siguiente manera:

- Calidad 1: Excelente o Bueno. Los embriones tienen una masa simétrica y esférica con blastómeros individuales que son uniformes en tamaño, color y densidad. Este embrión es consistente con su etapa de desarrollo esperada. Las irregularidades deberían ser relativamente menores, y al menos el 85% del material celular debe estar intacto, masa embrionaria viable. La zona pelúcida debe ser lisa y no tener superficies cóncavas o planas.

- Calidad 2: Regular. Estos embriones tienen irregularidades moderadas en la forma general de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos el 50% de la masa embrionaria debe estar intacta. La supervivencia de estos embriones en el procedimiento de congelación / descongelación es bajo, pero las tasas de gestación son adecuadas si los embriones se transfieren como frescos a receptoras adecuadas. Por tanto, estos embriones a menudo se denominan "transferibles" pero no "congelables".
- Calidad 3: pobre. Estos embriones tienen mayores irregularidades en la forma de la masa embrionaria o en tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos el 25% de la masa de embriones debe estar intacto. Estos embriones no sobreviven a procesos de congelación / descongelación y las tasas de gestación son más bajas.
- Calidad 4: muerto o degenerado. Estos podrían ser embriones, ovocitos o embriones de 1 célula. No son viables y deben descartarse.

1.2. Antecedentes

Con el objetivo de evaluar el efecto de adición de FSH en la maduración nuclear del ovocito de alpaca y la velocidad de división de embriones, utilizaron medio TCM-199 suplementado con 10% de FCS, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hCG, 0.2 mM de piruvato sódico, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de estradiol, $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH y $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina; según los siguientes tratamientos: T1 (Control): FSH por 42 h; T2: 21 h con FSH + 21 h sin FSH; T3: 21 h sin FSH + 21 h con FSH. Las proporciones de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II fueron 64.9, 49.2 y 53.8%, mientras las tasas de división de embriones fueron 39.1, 36.3 y 33.1% para T1, T2 y T3 respectivamente. Los resultados sugieren que el momento de la adición de FSH no tiene efecto sobre la maduración de ovocitos y la velocidad de división de embriones de alpaca (40).

Con el objetivo de determinar el efecto de las gonadotropinas en la maduración y fertilización de ovocitos en alpacas. Se obtuvieron ovarios de alpacas beneficiadas del matadero, trasladados en PBS a 37°C . Se aspiraron los ovocitos y los selectos fueron divididos en dos grupos de tratamiento (T): T1 con 1:5 (FSH : LH); T2 con 2:10 (FSH : LH), ambos grupos fueron madurados con medio TCM suplementado con 10% de SFB durante 36 h. La tasa de maduración fue 71.2% (T1) y 74.2% (T2); se obtuvo 60.7% de

fertilización para los ovocitos madurados con 1:5 (FSH : LH) y 64.1% para los ovocitos madurados con 2:10 (FSH : LH) en los resultados no hubo diferencia [$P > 0.05$] (78).

El objetivo fue evaluar el efecto del tiempo de incubación *in vitro* sobre la maduración nuclear del ovocito (Experimento 1) y determinar la tasa de división embrionaria de alpaca (Experimento 2). En el Experimento 1, se recolectaron complejo cúmulo – ovocito (COC) de ovarios del matadero. Los COC se maduraron con medio TCM-199 suplementado con 10% SFB más $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hCG, 0.2 mM de piruvato de sodio, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de estradiol. Los ovocitos después de 30, 34 y 38 h de maduración, se fijaron en etanol : ácido acético (3 : 1). Para el Experimento 1, las proporciones de ovocitos que alcanzaron la etapa de metafase II fueron 18.9, 42.9 y 65.8% para 30, 34 y 38 h de cultivo respectivamente ($P < 0.05$). En el experimento 2, la tasa de clivaje fue 9.5, 7.7 y 15.4% a 48 h de cultivo correspondiente a 30, 34 y 38 h de maduración de ovocito. Estos resultados indican que se requieren 38 h o más para la maduración de ovocitos de alpaca (37).

Se evaluó el efecto del tiempo de cultivo sobre la tasa de maduración nuclear y tasa de división pos fecundación a 72 h de ovocitos de alpacas. Experimento 1: los ovocitos fueron distribuidos en cuatro tiempos de maduración (30, 34, 38 y 42 h) y madurados en TCM-199 suplementado con 10% SFB, $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hCG, 0.2 mM de piruvato de sodio, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de estrógeno, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina. Experimento 2: los ovocitos fueron cultivados y fecundados con espermatozoides obtenidos de epidídimos. En el experimento 1 se obtuvo 26.3, 52.6, 68.5 y 75.3% de ovocitos en metafase II para 30, 34, 38 y 42 h de cultivo, respectivamente. En el experimento 2, la tasa de división fue 9.5, 8.1, 15.6 y 19.8% para 30, 34, 38 y 42 h, sin diferencia estadística entre grupos. La maduración prolongada en camélidos podría ser explicada por las características propias de la especie, son especies de ovulación inducida, requieren estímulos externos como la cópula. Los resultados del clivaje de embriones en alpacas respecto a camellos son bajos, probablemente se deban a posibles deficiencias en la implementación de la técnica, especialmente en las condiciones de fecundación y cultivo posfecundación. Los resultados sugieren que los ovocitos de alpacas requieren de 38 a 42 h de maduración para obtener estadios de metafase II (39).

Se evaluó el efecto del tiempo de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca. En uno de los experimentos, los COC fueron madurados *in vitro* en TCM-199 durante 24, 28 o 32

h, este medio fue suplementado, entre otros componentes, con $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de 17β – estradiol. La proporción de los ovocitos que alcanzaron a la etapa de metafase II fueron más altos después de 32 h de maduración *in vitro* ($P < 0.05$). En general, 46.3, 50.3 y 65.1% de los ovocitos alcanzaron la metafase II después de 24, 28 y 32 h de cultivo *in vitro*, respectivamente. Aunque no está claro el motivo de una menor tasa de maduración de ovocitos de alpaca en el presente estudio frente al estudio anterior en llama, una explicación posible podría estar relacionada con las condiciones nutricionales, corporales y de manejo de las alpacas que viven en ambientes alto andinas. Los tiempos de maduración usados en este experimento se parecen al intervalo desde el apareamiento hasta la ovulación descrito en esta especie (29.8 ± 2.1 h). El porcentaje de presuntos cigotos que se desarrollaron en día 2 a etapa de 2 a 8 células también fue más alto para los COC que maduraron *in vitro* durante 32 h. Las condiciones de maduración *in vitro* aún no se ha mejorado para lograr tasas aceptables de desarrollo de embriones después de la fertilización *in vitro* (38).

Con el objetivo de determinar los factores que pueden afectar la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca, se utilizó un diseño factorial de $2 \times 2 \times 2$, edad (jóvenes versus adultos), tamaño folicular (≥ 2 mm vs. < 2 mm) y medio de suplementación (con o sin suero fetal bovino [SFB]). El medio de maduración químicamente definido contenía FSH $15 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, LH $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Se recuperaron ovocitos de ovarios de 11 alpacas jóvenes (< 10 años) y 14 alpacas adultas (> 11 años). La maduración se definió como la visualización de un cuerpo polar al final del período de incubación. Una mayor proporción de ovocitos alcanzaron la maduración cuando se recolectaron de folículos ≥ 2 mm 36%, que desde folículos < 2 mm 8% ($P < 0.05$). Los ovocitos obtenidos de folículos ≥ 2 mm de alpacas adultas, alcanzaron una mayor proporción de maduración cuando se incubaron en medio suplementado con SFB que cuando no se incubaron con SFB. Es menos probable que los ovocitos de animales jóvenes hayan experimentado cambios morfológicos, celulares, bioquímicos, moleculares y epigenéticos, como se observa en ovocitos de mayor edad (6).

Se evaluó el efecto de temperatura y el tiempo de almacenamiento de ovarios de alpacas sobre la tasa de maduración y división pos-fecundación *in vitro*. Los ovarios fueron distribuidos al azar en los tratamientos (T): Control (0 h), T1 (16 h a $12-15^\circ\text{C}$) y T2 (16 h a $22-25^\circ\text{C}$). Se utilizó medio de maduración TCM-199 suplementado con FSH. Después de la MIV, parte de los ovocitos fueron fijados y teñidos para evaluar el estado

de maduración nuclear y los restantes fueron co-cultivados por 18 h con espermatozoides obtenidos de epidídimos. Los presuntos cigotos fueron colocados en medio de cultivo KSOM por 72 h posfecundación *in vitro* y luego transferidos a medio SOF. La tasa de maduración nuclear de ovocitos en metafase II fue 47.9, 12.2 y 32.7%, y la tasa de división fue 46.2, 8.1 y 32.7% para los grupos Control, T1 y T2, respectivamente ($P < 0.05$). Se evidencia que los ovarios de alpaca son susceptibles al almacenamiento en temperaturas de 12 a 15 °C y que la competencia del ovocito para FIV se ve disminuida; posiblemente debido a que en temperaturas inferiores a 20 °C los ovocitos sufren cambios de la membrana lipídica como ocurre en ovocitos bovinos, además las actividades metabólicas de los ovocitos disminuyen (49).

Uno de los objetivos fue comparar el estado de maduración del COC recuperados de alpacas después del tratamiento con dos protocolos de superestimulación: FSH y eCG. Se cultivaron los COC en grupos de 12 en 50 μL de medio de maduración consistente en TCM-199 suplementado con suero de ternera fetal tratado con calor al 10%, 0.2 mM piruvato de sodio, 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FSH, 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de 17 β -estradiol, y 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina. Luego de cultivo durante 26 h, una mayor proporción ($P < 0.05$) de COC alcanzaron la etapa de metafase II en el grupo de FSH vs. eCG [82 vs. 64%] (36).

Uno de los objetivos del estudio fue la fertilización y cultivo de COC recolectados quirúrgicamente de alpacas después del tratamiento con dos gonadotropinas diferentes (FSH o eCG). Se utilizó el medio de maduración TCM-199 suplementado con 10% de SFB más FSH 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, hCG 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Piruvato de sodio 0.2 mM, gentamicina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y estradiol 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La fertilización se realizó con espermatozoides del epidídimo capacitados con gradiente discontinuo Percoll (45% : 22.5%). Los presuntos cigotos se cultivaron en medio KSOM suplementado con 1 mM de glutamina, 0.3 mM de piruvato de sodio, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), y aminoácidos esenciales y no esenciales, BSA durante 3 días y cultivados en medio SOF durante 7 días. La tasa de clivaje fue 45.2 y 42.1% para grupo FSH y grupo eCG, respectivamente, a las 72 h de cultivo. Ambas gonadotropinas pueden usarse en el protocolo de FIV para alpacas (50).

Se diseñó un estudio para determinar la viabilidad del desarrollo de la maduración *in vitro*, la fertilización y sistemas de cultivo al utilizar ovocitos y espermatozoides epididimarios recolectados de llamas del matadero. Los COC recuperados, se cultivaron

en medio TCM-199 con sales de Earle. Se suplementó con $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LH, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de estradiol-17 y $25 \mu\text{M}$ de piruvato y 10% de suero de bovino durante 30 h. Evaluaron diferentes dosis de heparina. La maduración en estado de metafase II fue 30.4% a 30 h de cultivo. Los ovocitos fueron inseminados con espermatozoides epididimarios en medio FERT-TALP durante 18 h. Hubo 29.2% de fertilización total. La tasa de desarrollo embrionario total de 2 a 16 células fue 15.8%. Los resultados indican que es posible un sistema de fertilización *in vitro* en la llama utilizando material del matadero y que los ovocitos de la llama se pueden fertilizar en presencia de heparina y con espermatozoides epididimarios (41).

Se evaluó el efecto de diferentes medios de cultivo con suplemento de gonadotropinas, duración del período de cultivo, en la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos desnudos (DO) del camello. Los ovocitos fueron aspirados de ovarios recolectados del matadero. Los DO se cultivaron en TCM-199, Ham's F-10 o RPMI-1640. Estos medios fueron suplementados con 10% suero de camello dromedario preñada, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ PMSG + $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hCG, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de gentamicina. Se cultivó durante 28, 32 y 42 h. La suplementación con gonadotropinas en medios de cultivo mejoró significativamente ($P < 0.05$) la tasa de maduración meiótica de los DO que aquellos cultivados en medios sin gonadotropina (20.58% vs. 16.04%). Las diferencias entre los diferentes medios de cultivo pueden atribuirse a la composición de los medios a las diferencias en su concentración iónica. Estudios previos demostraron que las gonadotropinas son reguladores primarios de la maduración nuclear *in vitro* de ovocitos de mamíferos (79).

Se evaluó el efecto de las hormonas FSH y LH sobre las tasas de maduración, fertilización y desarrollo embrionario *in vitro*. Se utilizaron ovocitos de ovarios bovinos del matadero, fueron madurados en medio base TCM - 199 suplementado con FSH y LH, conformándose cuatro tratamientos: T1: sin hormonas, T2: $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ FSH + $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ LH; T3: $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ FSH + $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ LH y T4: $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ FSH + $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ LH. No se presentó efecto ($P > 0.05$) entre tratamientos suplementados con FSH y LH sobre la tasa de maduración y la tasa de divisiones tempranas. La adición de LH en mayor proporción respecto a la FSH en medio de maduración induce mayor tasa de maduración y desarrollo embrionario *in vitro*. Los ovocitos al ser extraídos de folículos y cultivados en medio adecuado, inician la maduración nuclear en ausencia de FSH y LH, debido a que son retirados los factores inhibidores de la meiosis. La baja tasa de división presentada cuando los ovocitos fueron madurados en ausencia de hormonas FSH y LH,

podría inferirse en la falta de adquirir la capacidad de desarrollo embrionario por ausencia del estímulo hormonal (FSH y LH) necesario para la adecuada reanudación de la meiosis (80).

El objetivo fue evaluar los efectos dependientes de dosis de gonadotropinas, individualmente (Bravelle [B], Luveris [L], Menupur [M], Repronex [R], Gonal-F [G], Follism [F] y Norvarel [N]) o en combinación (Menupur Bravelle; Repronex Bravelle; y Bravelle Norvarel), sobre tasas de maduración de ovocitos bovinos, fertilización y desarrollo embrionario temprano *in vitro*. Los COC se compraron comercialmente y se cultivaron en TCM - 199 con SFB al 10% suplementado con concentraciones variables de gonadotropina (0, 5, 10, 20, 40 UI o unidad USP mL⁻¹) durante 24 y 48 h según los protocolos de FIV. Todas las gonadotropinas potenciaron la maduración de los ovocitos *in vitro* de una manera dependiente de la dosis. Las hormonas, Gonal-F (FSH), Follism (FSH) y Repronex (FSH / LH); Luveris (LH) y Menupur (hMG) pueden mejorar significativamente la expansión del COC bovino después del cultivo durante 24 h, además pueden estimular la maduración de ovocitos bovinos *in vitro*. Estas hormonas regulan la sincronización de maduración de ovocitos al retrasar la transición de los ovocitos de la etapa metafase I a metafase II, de forma similar a la acción de GnRH-A durante la maduración *in vitro* (47).

Otro estudio continuo al anterior mencionan que probablemente el tiempo óptimo de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos es aproximadamente 24 h para cualquier combinación de gonadotropinas a una concentración de 40 IU mL⁻¹, utilizando esta dosis, las diferentes combinaciones de tasas de maduración fueron 88.4; 93.4; 80.7; 80.9; 82; 81.7; 14.2%, mientras las tasas de desarrollo embrionario temprano (8 a 16 células) fueron 33.3; 34.1; 40; 50; 41.5; 31.3% para las combinaciones R+F; M+F; R+B; M+B; R+G; M+G; grupo testigo (CG) respectivamente. Hubo diferencias en las tasas de maduración para diferentes combinaciones de gonadotropinas en comparación con el grupo control; sin embargo, no hubo diferencias significativas entre estos grupos para las etapas de 8 a 16 células. Es difícil determinar la dosis de gonadotropinas y / o hCG que se utilizará, especialmente en el caso de los protocolos combinados. Estos datos proporcionan soporte para la capacidad de respuesta de los ovocitos bovinos a las gonadotropinas *in vitro* y la necesidad de considerar variaciones en las concentraciones relativas y la proporción de combinaciones (FSH / LH o hCG) para la optimización de la competencia del desarrollo de ovocitos (47).

Uno de los objetivos fue evaluar concentraciones (1 vs. 2.5 vs. 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de FSH comercial Pluset® (50% de FSH y LH [1:1]) y Folltropin® (84% de FSH y 16% de LH [5.25:1]), en la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos. Los ovocitos recuperados se maduraron durante 24 h en medio TCM199- HEPES; 2.2 g L^{-1} de bicarbonato de sodio; piruvato sódico 0.2 mM; sulfato de gentamicina 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 10% de SFB, suplementado con 100 μM de cisteamina y FSH según cada experimento. No se observaron diferencias en metafase II para las concentraciones evaluadas FSH Pluset® y Folltropin® (MII 65; 63.9; 70.9%: Pluset® 1; 2.5; 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$; MII 52.4; 58.3; 57.9%: Folltropin® 1; 2.5; 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente). En relación con la FSH de origen animal, todas las representaciones disponibles tienen algún grado de contaminación con otras hormonas (principalmente LH). La concentración de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH Pluset® o Folltropin® es suficiente para promover una maduración *in vitro* adecuada de ovocitos bovinos. Puede haber un efecto sinérgico beneficioso entre FSH y LH *in vitro* capaz de promover la expresión de los receptores de membrana para dichas hormonas (81).

Con el objetivo de determinar la velocidad de maduración de ovocitos bovinos sudafricanos indígenas, después de la maduración *in vitro*, en medios suplementados con diferentes concentraciones de hormonas y seleccionados mediante tinción con azul de cresilo brillante (BCB). Se suplementó con hormonas de tres concentraciones en tratamientos (T). El T1: 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH, 5 mg mL^{-1} LH, y 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ E2; T2: 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FSH, 6 mg mL^{-1} LH, y 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ E2; y T3: 1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FSH, 7 mg mL^{-1} LH y 4.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ E2. El T2 tuvo tasa de maduración más alta para ambos tratamientos de ovocitos BCB+ (65.6%) y no expuestos a BCB- (60.3%) en comparación con T1 (22, 3.03 y 16% para BCB+, BCB- y no expuestos a BCB, respectivamente) y T3 (48, 2.2 y 48% para BCB+, BCB-, y no expuestos a BCB, respectivamente). Probablemente los ovocitos BCB+ tienen mayor volumen citoplasmático, además es más probable que se fertilicen y contengan un número mayor de copias de ADN mitocondrial; por tanto, los ovocitos BCB+ tendrían una mejor capacidad de desarrollo en comparación con los ovocitos BCB- (82).

Se investigó la influencia de FSH sobre las tasas de maduración *in vitro* de ovocitos de oveja y los niveles de expresión del receptor de la hormona folículo estimulante (RFSH), receptor de hormona luteinizante (RLH) y receptor de hormona liberadora de gonadotropina (RGnRH) en respuesta del COC al tratamiento con FSH. Los COC se cultivaron 26 h en medio de maduración basal (bMM) que consistió en 9.5 g de M199,

2.2 g de NaHCO_3 , 25 mg de piruvato de sodio, 4.8 g de HEPES, 50 mg de ampicilina sódica, 50 mg de sulfato de estreptomicina. El medio de maduración que contiene bMM se suplementaron con L-glutamina 0.68 mM, NaHCO_3 25 mM, suero de ternera fetal al 10%, suero bovino fetal al 5%. Se suplementaron con 0, 5, 10, 20 y 30 UI mL^{-1} de FSH, asignándose a grupos FSH-1 (línea basal), FSH-2, FSH-3, FSH-4 y FSH-5. Las tasas de maduración de ovocitos mejoraron gradualmente cuando el suplemento de FSH aumentó de 0 a 10 mg mL^{-1} . El grupo FSH-3 mostró la tasa de maduración más alta 48.5%. Los niveles de expresión de RFSH y RLH mRNAs en FSH-3 y FSH-4 fueron significativamente más altos que en FSH-1. Los niveles de expresión de las proteínas RFSH en los grupos FSH-3 y FSH-4 fueron más altos que del grupo FSH-1. La adición de FSH en los medios de MIV podría mejorar la expresión de las proteínas RFSH y RGnRH en los COC, resultando aumento en la tasa de maduración de ovocitos (83).

El objetivo fue evaluar los efectos de LH en la maduración *in vitro* de ovocitos, apoptosis y las expresiones génicas de RLH y RFSH en COC de ovejas. Los COC se maduraron *in vitro* durante 24 h en medio de cultivo basal (bMM) similar al experimento anterior, suplementado con concentraciones variables de LH (0, 5, 10, 20 y 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) asignándose a grupos LH-1 (grupo control), LH-2, LH-3, LH-4 y LH-5, respectivamente, además un grupo de FSH (10 IU mL^{-1}) fue como un control positivo (grupo de FSH). Los resultados mostraron que las tasas de maduración de los ovocitos mejoraron a medida que la concentración de LH aumentó de 0 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, alcanzando máximo en el grupo LH-3 (44.3%); fue menor grupo LH-5 (33.2%). Los niveles de expresión de mARN de RFSH aumentaron cuando las concentraciones de LH fueron mayores. Las expresiones del mARN de RFSH se encontraron en mayor proporción en el grupo LH-5, mARN RLH en el grupo LH-3 y LH-4 ($P < 0.01$) en comparación con los del grupo control (LH-1). Los niveles de expresión en proteínas RLH se incrementaron en el grupo LH-3 versus LH-1. La adición de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de LH en el medio MIV fue la concentración óptima de LH para la MIV de los COC de oveja. La suplementación de LH en el medio MIV podría aumentar los niveles de los mARN de RFSH y mejorar los niveles de mARN de RLH y las proteínas de los ovocitos de oveja (84).

El objetivo fue evaluar el efecto de gonadotropinas recombinantes humanas (r-FSH y r-LH) sobre la maduración *in vitro* y el desarrollo de ovocitos de oveja. Los ovocitos recuperados de animales sacrificados se dividieron en cinco grupos. Todos los grupos se maduraron en un medio que contenía TCM 199 con 4 mg mL^{-1} de BSA, 100 μM de

cisteamina y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de 17β - estradiol por 24 h. A cada grupo se asignó diferente dosis de gonadotropina. Los resultados de la maduración por grupo fueron: 60% (sin gonadotropinas); 81.9% (r-FSH: 0.1 UI mL^{-1}); 60.7% (r-LH: 0.1 UI mL^{-1}); 91.9% (r-FSH: 0.1 UI mL^{-1} + r-LH: 0.1 UI mL^{-1}); 84% (gonadotropinas hipofisarias, hG), mientras la tasa de clivaje fue 36.7; 69.9; 55.2; 81.4; 82.3% para cada grupo respectivamente. Los tratamientos r-FSH, r-FSH+ r-LH, hG tuvieron mayores ($P < 0.05$) tasas de maduración versus r-LH, sin gonadotropinas. Los grupos r-FSH + r-LH, hG presentaron mayores ($P < 0.05$) tasas de clivaje seguido de r-FSH, r-LH, sin gonadotropinas, respectivamente. Los ovocitos cultivados sin gonadotropinas no tuvieron expansión de las células de la granulosa, la adición de FSH y / o LH mejora la expansión de las células de la granulosa. En otros estudios se demostró que la LH sola no tuvo ningún efecto sobre el desarrollo potencial de ovocitos bovinos; hecho que puede deberse a que usaron LH recombinante (85).

El objetivo fue evaluar las concentraciones de la FSH, LH y estradiol (E2) durante la maduración *in vitro* de ovocitos de oveja Tan. Los ovocitos de oveja fueron divididos en cinco grupos para el cultivo de maduración *in vitro* en medio TCM-199 por 22 a 24 h, los resultados de la tasa de maduración (%; grupo de hormona $\mu\text{g mL}^{-1}$) fueron: 35.4% (0 FSH); 41.6% (10 FSH); 48% (50 FSH); 55% (100 FSH); 47.9% (200 FSH), 41.1% (300 FSH); para grupo LH: 35.4% (0 LH) 37.8% (5 LH) 41.7% (10 LH); 50% (20 LH); 45.9% (50 LH); 42.6% (100 LH); para grupo E2: 35.4% (0 E2); 36.4% (5 E2); 38.7% (10 E2); 49% (25 E2); 53.9% (50 E2); 41.8% (100 E2); para la combinación FSH + LH: 64.6% ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$ FSH + $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ LH). Se analizó la velocidad de liberación de los primeros cuerpos polares. La tasa de maduración en el grupo $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH + $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ LH alcanzó la más alta ($P < 0.05$) que los otros cuatro grupos; el grupo LH $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue más alta ($P < 0.05$) respecto a otros grupos de concentraciones de LH; el grupo de E2 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue superior ($P < 0.05$) versus otras concentraciones. En las condiciones experimentales, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH + $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LH fue la combinación de hormonas más apropiada para la maduración de ovocitos de oveja Tan (86).

Se comparó los efectos de FSH y LH en la maduración *in vitro*, apoptosis y función de secreción en ovocitos de oveja, las expresiones génicas de receptores (RFSH, RLH y RGnRH) en complejos cúmulos-ovocito. Los COC se recuperaron de ovarios se cultivaron durante 24 h en medio MIV suplementado con concentraciones de LH, FSH. La morfología del núcleo se evaluó mediante tinción con Lacmoid al 1%; cuyos

resultados de maduración (%; grupo de tratamiento) fueron: 38.7% (sin LH, sin FSH); 43.5% (FSH 5 IU mL⁻¹); 48.5% (FSH 10 IU mL⁻¹); 46.3% (FSH 20 IU mL⁻¹); 44.6% (FSH 30 IU mL⁻¹); 38.2% (LH 5 µg mL⁻¹); 44.1% (LH 10 µg mL⁻¹); 38.2% (LH 20 µg mL⁻¹); 33.3% (LH 30 µg mL⁻¹). Las tasas de maduración de los ovocitos mejoraron gradualmente a medida que la concentración de aumentó de 0 a 10 LH (µg ml⁻¹) y FSH (UI mL⁻¹), alcanzando un valor máximo de 44.1% en grupo LH-2 y 48.5% en FSH-2. Las concentraciones de 10 o 20 UI mL⁻¹ de FSH, 10 µg mL⁻¹ de LH fueron mayores (P < 0.05) que el grupo sin FSH o LH. Los niveles de expresión de los mARN de RFSH, RLH y RGnRH del grupo FSH 10 UI mL⁻¹, LH 10 o 20 µg mL⁻¹, fueron superiores que el grupo sin FSH o LH. Los niveles de proteínas RFSH en los grupos FSH 10 o 20 UI mL⁻¹ fueron mayores que el grupo sin FSH o LH. La FSH y LH potenciaron los niveles de expresión de los mARN de RFSH, RLH y RGnRH de los COC de ovejas (87).

Se evaluó los efectos de la eCG en la maduración *in vitro* de ovocitos de oveja, apoptosis y niveles del mARN de receptor de hormona folículo estimulante (RFSH), receptor de hormona luteinizante (RLH) y expresión de receptor de hormona liberadora de gonadotropina (RGnRH). Los complejos de cúmulos y ovocitos (COC) se recuperaron de ovarios de oveja y se agruparon, se cultivaron en medio de cultivo basal (bMM) que consistió en 9.5 g de Medio 199, 2.2 g de NaHCO₃, 25 mg de piruvato de sodio, 4.8 g de 4- (2-hidroxietilo) -1-ácido piperazinaetanosulfónico (HEPES), 50 UI de ampicilina sódica, 50 mg de sulfato de estreptomicina. El medio de maduración bMM fue complementado con 0.68 mM de L-glutamina, 2.1 g de NaHCO₃, 10% de suero de ternera fetal y 5% de suero bovino fetal. Se suplementó con 0, 5, 10, 20 o 30 µg mL⁻¹ de eCG. Los resultados de la maduración por grupo (%; grupo de tratamiento) fueron: 36.5% (sin eCG ni FSH); 45.8% (eCG: 5 µg mL⁻¹); 46.4% (eCG: 10 µg mL⁻¹); 51.7% (eCG: 20 µg mL⁻¹); 45.0 % (eCG: 30 µg mL⁻¹); 48.5% (FSH: 10 UI mL⁻¹). Las tasas de maduración de los ovocitos de las ovejas aumentaron gradualmente a medida que la concentración de eCG se elevó de 0 a 20 µg mL⁻¹. La expresión de mARN de RFSH, RLH y RGnRH aumentó en comparación con 0 µg mL⁻¹ de eCG. La dosis de eCG se correlacionó positivamente con la expresión de mRNA y proteína RFSH, RLH y de RGnRH. La adición de eCG a medio MIV mejoró la expresión del mARN de RFSH, RLH y proteína de RGnRH en los COC de oveja (63).

El estudio tuvo como objetivo evaluar la sustitución de FSH y LH por eCG en la maduración *in vitro* de ovocitos, FIV y en el desarrollo *in vitro* de embriones de cabra. El

primer experimento fue evaluar la dosis de eCG y hCG en la maduración *in vitro* de ovocitos; el segundo fue comparar el desarrollo embrionario madurados en un medio suplementado con eCG solo o en combinación con hCG. La suplementación de 20 UI mL⁻¹ de eCG en los medios de maduración aumentó significativamente ($P < 0.05$) la velocidad de maduración. Los ovocitos madurados con 20 UI mL⁻¹ de eCG tuvieron buena maduración citoplásmica que permite el desarrollo normal del embrión hasta la etapa del blastocisto sin la adición de hCG. Por lo tanto, se puede usar eCG 20 UI mL⁻¹ en medio de maduración para reducir el costo de la producción de embriones *in vitro*. La tasa de escisión de los ovocitos caprinos madurados en un medio suplementado con 20 UI mL⁻¹ de eCG fue comparativamente mayor después de la activación partenogénica con ionomicina / 6-DMAP (6-dimetilaminopurina) que la FIV (88).

Se llevaron a cabo experimentos para determinar los efectos de los agentes inhibidores de la meiosis y las gonadotropinas en la maduración nuclear de ovocitos caninos. El medio de cultivo fue TCM 199 +10 ng mL⁻¹ de EGF suplementado con β -mercaptoetanol 25 mM, piruvato 0.25 mM y L-glutamina 1.0 mM (TCM basal). Inicialmente, los ovocitos se cultivaron en TCM basal solo o en TCM basal + dibutilil adenosina cíclico (0.5, 1, 5, o 10 mM dbcAMP) durante 24 h, luego los ovocitos se cultivaron con roscovitina TCM basal + 25 mM durante 17 h, se expusieron brevemente a 0.5 UI mL⁻¹ de eCG y luego se cultivaron en TCM basal durante 48 h. La exposición corta de ovocitos a eCG fue beneficiosa, ya que aumentó significativamente la proporción de ovocitos que se desarrollan más allá de la vesícula germinal. El estado meiótico de metafase II de los ovocitos caninos cultivados durante 52, 51, 50, 48 h después de la exposición a 0.5 IU de eCG durante 0, 60, 120 o 240 minutos sin o después de 15-17 h de preincubación en presencia de roscovitina, resultaron alrededor de 18% de ovocitos en metafase II expuesto a eCG por 60 a 240 min versus 9.7% de no expuestos. Se cree que el efecto beneficioso del eCG sobre la maduración nuclear de los ovocitos caninos se debe a la actividad de FSH (89).

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1. Identificación del problema

La alpaca es una especie poco estudiada en aspectos reproductivos, la aplicación de las biotecnologías reproductivas es limitada. La complejidad de los patrones reproductivos de esta especie contribuye a la escasa investigación (3, 32). El intervalo parto - parto de las alpacas es largo, obteniéndose alrededor de 3 crías en su vida reproductiva, hecho que limita la optimización de recursos genéticos de alta calidad. El uso de gametos en biotecnologías reproductivas para la mejora genética aún no está optimizado.

La biotecnología reproductiva de producción de embriones *in vitro*, como una alternativa para obtener animales de alto valor genético en menor tiempo; aún no es eficiente en camélidos, avanza lentamente frente a otras especies (5). No se informó el nacimiento de crías de alpacas a partir de embriones producidos *in vitro* (90). Uno de los factores que afecta esta tecnología son los medios de maduración de ovocitos, fertilización y cultivo de embriones *in vitro* que aún están en etapas iniciales de estudio. Las tasas de maduración *in vitro* de ovocitos son menores, cuando no se usa gonadotropinas como suplemento en medio de maduración (47, 80, 91); sin embargo, el efecto de las gonadotropinas y su importancia en la maduración de ovocitos, fertilización y el desarrollo temprano del embrión siguen siendo controversiales (35).

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 (92). En

ovinos, durante la maduración *in vitro* de ovocitos, los niveles de expresión de los mARN y las proteínas de RFSH en los complejos cúmulo – ovocito tratados con FSH fueron más elevados que en los grupos tratados con LH (87). La reanudación meiótica en ovocitos ocurre por aumento de LH, provoca el cierre de las uniones Gap y disminuye los niveles de cAMP incrementándose la inactivación de proteína quinasa A (PKA), se activa el factor promotor de la maduración. La FSH regula la proliferación de células somáticas y la detención meiótica de ovocitos en el folículo inmaduro a través de las vías de cAMP / PKA (28).

2.2. Enunciados del problema

a) Formulación del problema general

¿Cómo influyen las gonadotropinas FSH, LH y eCG en la maduración *in vitro* de ovocitos y en la tasa de clivaje en embriones de alpacas?

b) Formulación de los problemas específicos

¿Qué efecto provoca las diversas concentraciones de FSH, LH y eCG en la maduración *in vitro* de ovocitos de alpacas?

¿Cómo afecta las diferentes dosis de FSH, LH y eCG utilizadas en la maduración *in vitro* de ovocitos sobre la tasa de clivaje en embriones de alpacas?

2.3. Justificación

El mejoramiento genético de las alpacas es lento por su propia fisiología reproductiva. En los programas de mejoramiento genético, las biotecnologías reproductivas pueden acortar el tiempo entre generaciones de los animales (93). La biotecnología reproductiva permitiría la propagación de individuos genéticamente superiores, especialmente aquellos con fibra de excelente calidad (3). Por tanto, se posibilitaría la optimización del uso de animales con alta calidad de fibra para la industria.

La investigación en camélidos sudamericanos ha sido mínima con resultados poco satisfactorios (3, 32); algunos estudios fueron realizados en ambientes que no corresponden a su hábitat. Por lo que, hay necesidad de realizar estudios para mejorar la producción de embriones *in vitro* en alpacas. Los medios de cultivo afectan la

optimización de la maduración *in vitro* de ovocitos, fertilización y clivaje de embriones; la suplementación de gonadotropinas en el medio de maduración merecen atención, en las concentraciones de FSH, LH y eCG, para optimizar la obtención de embriones producidos *in vitro*. La suplementación de gonadotropinas probablemente sea elemental en la maduración de ovocitos. Las tasas de maduración *in vitro* de ovocitos son menores, cuando no se usa gonadotropinas en medio de maduración (47, 80, 91), 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 (56).

La hormona FSH actúa sobre los receptores de las células de granulosa desde allí provoca reacciones en cascadas que mantiene al ovocito en arresto meiótico; mientras niveles altos de LH tiene receptores en las células murales que desencadenan una serie de reacciones que conducen a la disminución del cAMP en el ovocito que provocan la reanudación de la meiosis I hasta metafase II. La eCG por tener características de FSH y LH, estas actuarían de forma similar; sin embargo, todavía no está claro los mecanismos de acción de las gonadotropinas en el proceso de maduración de ovocitos *in vitro*. A pesar que existen estudios iniciales en alpacas, los resultados con uso de FSH y LH en maduración *in vitro* de ovocitos no son suficientes, aún falta reforzar los estudios para la obtención de embriones, por tanto, el uso de gonadotropinas en procesos de maduración *in vitro* requiere atención en camélidos. Los resultados podrían coadyuvar al desarrollo de protocolos estandarizados para la maduración *in vitro* de ovocitos y cultivo de embriones que contribuirían la producción de crías de camélidos derivado de tecnologías *in vitro* (6). Además, ayudaría al mejoramiento genético de alpacas y su aplicación en la ganadería camélida.

2.4. Objetivos

2.4.1. Objetivo general

Evaluar la influencia de la FSH, LH y eCG en la maduración *in vitro* de ovocitos y clivaje de embriones de alpacas.

2.4.2. Objetivos específicos

- Determinar la maduración nuclear en metafase II de ovocitos de alpaca, suplementadas con diversas concentraciones de FSH, LH y eCG en cultivos *in vitro*.
- Evaluar el clivaje de embriones después de la maduración *in vitro* de ovocitos donde se utilizó diferentes dosis de FSH, LH y eCG.

2.5. Hipótesis

2.5.1. Hipótesis general

La suplementación con hormonas FSH, LH y eCG durante la maduración *in vitro* de ovocitos, influyen positivamente en el reinicio de meiosis I hasta progresar a metafase II, luego, repercuten en la división de 2 a 8 células de embriones de alpacas.

2.5.2. Hipótesis específicas

- La adición al medio de maduración de FSH, LH y eCG en conjunto mejoran el reinicio de meiosis I hasta la progresión a metafase II en ovocitos de alpacas cultivados *in vitro*.
- La división de 2 a 8 células embrionarias es afectada favorablemente, al utilizar FSH, LH y eCG en la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

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 (94). Pertenece a zona agroecológica de puna seca (95), 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 (96).

3.2. Población

La población fue ovocitos de ovarios recolectados de alpacas Huacaya adultas no preñadas faenadas en mataderos de los distritos de Nuñoa, Ayaviri, Santa Lucía del departamento de Puno y Centro Poblado de Chichas del distrito de Callalli del departamento de Arequipa.

3.3. Muestra

El método y el tamaño muestral fueron considerados por conveniencia (no probabilístico). De un total de 451 ovarios de alpacas Huacaya, se obtuvieron 2410 ovocitos de alpaca entre las categorías A y B.

3.4. Métodos de investigación

Todos los químicos y reactivos que se utilizaron en el experimento se muestran en el Anexo 3.

3.4.1. Maduración nuclear en metafase II de ovocitos de alpaca con gonadotropinas en cultivo *in vitro*

a) Obtención de ovarios y transporte

Los ovarios (n = 451) se obtuvieron de centros de beneficio de alpacas descritos en el ítem 3.2. 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.* (39) 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 estreptomina, 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.

b) 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.* (49) 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 (33), clasificando en tres tipos de ovocitos: categoría A: calidad buena; categoría B: calidad intermedia; categoría C: rechazados (Tabla 1). 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.

c) Maduración *in vitro* de ovocitos

La maduración de ovocitos se realizó de acuerdo a lo descrito por Ratto *et al.* (44) con algunas modificaciones. Se utilizó ovocitos de categoría A (n = 970) y B (n = 1552), estos se colocaron en grupos de 8 a 16 ovocitos en gotas de 80 μL de medio de maduración, en placas Petri de 30 x 15 mm cubiertos con aceite de mineral. La maduración se realizó en incubadora de CO_2 mantenidos con 6.1% de CO_2 ; 5% de O_2 ; a 38.5 °C con alta humedad similar al que usó Leisinger *et al.* (6) 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 CO_2 .

El medio de maduración estuvo compuesto por TCM – 199 con 10 mM HEPES, 2.0 mM 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 ng mL^{-1} de EGF; 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de 17 β estradiol, FSH (0.25; 0.50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), LH (2.5; 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), eCG (5; 15 UI mL^{-1}), 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina.

La solución Stock contenía TCM – 199 con HEPES más NaHCO_3 , se almacenó a temperatura de refrigeración de 4.5 °C hasta por 2 meses para su uso. A esta se agregó componentes alicuotados que se mantenían congelados: suero fetal bovino, piruvato de sodio, cisteína, glutamina, gentamicina; esta solución se filtró con membrana de 0.22 μm de filtro de jeringa, seguidamente se adicionó EGF, 17 β - estradiol, y los tratamientos a diferentes concentraciones de FSH (0.25; 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), LH (2.5; 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), eCG (5; 15 UI mL^{-1}). El medio de maduración se colocó en gotas de 80 μL cubiertas con aceite de mineral dentro de placas Petri que fueron mantenidos en la incubadora de CO_2 para su estabilización hasta la colocación de ovocitos. Los medios fueron preparados al interior de la cámara de flujo laminar.

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*.

d) 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.* (38) con modificaciones, donde los ovocitos incubados por 36 h en cámara de CO₂ 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.* (39) 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.* (44), como vesícula germinal, vesícula germinal rota, metafase I, metafase II, degenerados (Tabla 2). Se consideró ovocito maduro nuclearmente cuando se alcanzó a la etapa de metafase II.

e) Obtención y capacitación de espermatozoides

La colección del semen de alpaca se realizó con maniquí según utilizado por Bravo *et al.* (97) con modificaciones. Se utilizaron dos alpacas machos adultos de fertilidad conocida. La vagina artificial fue cubierta con frazadilla eléctrica cuya temperatura del ducto vaginal fue alrededor de 43 °C al momento de colocar al maniquí. El macho se mantuvo montado al maniquí alrededor de 15 a 25 min. El semen colectado se mantuvo en baño María a 37 °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 4×10^6 espermatozoides por mL (93). Conocida la viabilidad del espermatozoide se utilizó para la inseminación *in vitro*. En la evaluación macroscópica del semen se consideró la cantidad, color y filancia; mientras en la evaluación microscópica se

tomó en cuenta la motilidad total y vitalidad. Estas evaluaciones se realizaron antes del inicio del experimento, a mitad y al final- 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.* (49) 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⁻¹ 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.* (98) compuesto por: 100 mM NaCl; 2 mM CaCl₂. 2H₂O, 3.1 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂.6H₂O, 0.3 mM NaH₂PO₄.H₂O, 21.6 mM lactato de Na, 1 mM piruvato de Na, 25 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 0.6% (p/v) BSA fracción V, 25 µg mL⁻¹ de gentamicina.

La solución Stock del medio TALP- Sperm contenía NaCl, KCl, NaH₂PO₄.H₂O, NaHCO₃, HEPES, se mantuvo en refrigeración a 4.5 °C hasta por 2 meses para su uso. A esta se agregó componentes alicuotados que se mantenían congelados: CaCl₂. 2H₂O, MgCl₂.6H₂O, lactato de Na, piruvato de Na, gentamicina; componente no congelado BSA fracción V. Este medio se filtró con membrana de 0.22 µm de filtro de jeringa, se colocó dentro de la incubadora de CO₂ para su estabilización hasta su utilización en la capacitación espermática. Los medios fueron preparados al interior de la cámara de flujo laminar.

f) 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 4×10^6 espermatozoides mL^{-1} , 25% de motilidad). La co-incubación fue durante 12 h en la cámara de CO_2 mantenidos con 6.1% de CO_2 , 5% de O_2 , a 38.5 °C con alta humedad.

El medio Fertil - TALP se preparó con los componentes utilizados por Bavister *et al.* (98) compuesto por: 114 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.4 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 11 mM lactato de Na, 0.2 mM Piruvato de Na, 25 mM NaHCO_3 , 0.6% (p/v) BSA libre ácido grasos, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina.

La solución Stock del medio Fertil - TALP contenía: NaCl, KCl, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , luego de su preparación se almacenó en refrigeración a 4.5 °C hasta su utilización dentro de 2 meses. A la solución Stock, se agregó componentes alicuotados que se mantenían congelados: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, lactato de Na, piruvato de Na, heparina y gentamicina, componente no congelado: BSA fracción V. Este medio se filtró con membrana de 0.22 μm de filtro de jeringa. Luego se colocó en gotas de 50 μL cubiertos con aceite de mineral. Los medios fueron preparados al interior de la cámara de flujo laminar.

3.4.2. Clivaje de embriones después de la maduración *in vitro* de ovocitos donde se utilizó diferentes dosis de gonadotropinas

a) Cultivo embrionario

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_2 mantenidos con 6.1% de CO_2 , 5% de O_2 , a 38.5 °C con alta humedad.

El medio SOF se preparó con los componentes utilizados por Holm *et al.* (99) con ligera modificación compuesto por: 107.7 mM NaCl, 7.2 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 25.0 mM NaHCO_3 , 1.5 mM MgSO_4 , 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ rojo fenol, 1.8 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5.4 mM DL-lactato de Na, 7.3 mM piruvato de Na, 0.2 mM L-glutamina, 3 mg mL^{-1} BSA fracción V, 45 $\mu\text{L mL}^{-1}$ BEN

aminoácidos esenciales, 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ MEN aminoácidos no esenciales, 10 ng mL^{-1} EGF, 0.3 mM ácido cítrico, 2.8 mM Myo-inositol, 2% de SFB, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ gentamicina.

La solución Stock del medio SOF contenía: NaCl, KCl, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , luego de su preparación se almacenó en refrigeración a 4.5 °C hasta su utilización dentro de 2 meses. A la solución Stock se agregó componentes alicuotados que se mantenían congelados: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, lactato de Na, piruvato de Na, glutamina, EGF, ácido cítrico, myo-inositol, SFB, gentamicina; componentes no congelados: BSA fracción V, BEN aminoácidos esenciales, MEN aminoácidos no esenciales. Este medio se filtró con membrana de 0.22 μm de filtro de jeringa. Luego se colocó en gotas de 50 μL cubiertos con aceite de mineral. Los medios fueron preparados al interior de la cámara de flujo laminar.

b) Evaluación de la división embrionaria

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).

3.4.3. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, 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 diferencias entre grupos se usó la prueba de Bonferroni. Los resultados fueron considerados significativos cuando $P \leq 0.05$.

Los 2410 ovocitos de alpaca de categoría A y B fueron divididos al azar en nueve grupos de tratamientos (T) con cinco repeticiones (Tabla 3, Tabla 4), conducidos bajo el diseño completamente al azar, cuyo modelo estadístico fue:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

Y_{ij} = Son las observaciones (% GV, GVBD, MI y MII; División embrionaria)

μ = Es la constante, media de las observaciones.

t_i = Es el efecto de los tratamientos (Concentraciones de FSH, LH y eCG).

e_{ij} = Es el efecto del error experimental que está distribuido como ε DNI (0, $\sigma^2\varepsilon$).

Tabla 3

Distribución de ovocitos de alpaca en grupos de tratamientos con gonadotropinas a diferentes concentraciones para la maduración in vitro.

Tratamiento	FSH $\mu\text{g mL}^{-1}$	LH $\mu\text{g mL}^{-1}$	eCG UI mL^{-1}	Ovocitos n	Réplicas
T1	0	0	0	252	5
T2	0	0	5	258	5
T3	0	0	15	279	5
T4	0.25	2.5	0	280	5
T5	0.25	2.5	5	262	5
T6	0.25	2.5	15	274	5
T7	0.5	5	0	282	5
T8	0.5	5	5	273	5
T9	0.5	5	15	250	5

Tabla 4

Distribución de presuntos cigotos de alpaca, según grupos de tratamientos utilizados en la maduración in vitro, destinados a cultivo de embriones.

Tratamiento *	Presuntos cigotos n	Réplicas
T1	152	5
T2	157	5
T3	171	5
T4	163	5
T5	152	5
T6	156	5
T7	172	5
T8	169	5
T9	144	5

* Tratamientos correspondientes a la maduración *in vitro* de ovocitos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Maduración nuclear en metafase II de ovocitos de alpaca con gonadotropinas en cultivo *in vitro*

Se consideró ovocito maduro nuclearmente cuando progresó a metafase II. Se observó a microscopía óptica, la extrusión del primer cuerpo polar que contiene un conjunto de cromosomas; mientras el otro conjunto (segundo) de cromosomas se retuvo en el ovocito (Figura 6).

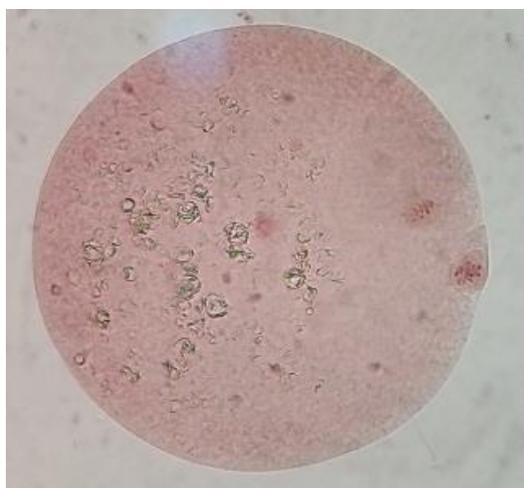


Figura 6. Ovocito en etapa nuclear de metafase II observado con microscopio a objetivo 100 x.

Los resultados de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca se muestran en la Tabla 5, se obtuvo mayor ($P \leq 0.05$) porcentaje de maduración de ovocitos en metafase II en los tratamientos suplementados con FSH $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ más LH $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ más eCG 0 o 5 o 15 UI mL^{-1} versus el resto de los tratamientos. En las concentraciones de FSH $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ más LH $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ más eCG 15 UI mL^{-1} versus FSH $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ más LH $5 \mu\text{g}$

mL⁻¹ sin eCG no hubo diferencia ($P > 0.05$) en el porcentaje de ovocitos de alpaca en metafase II. Entre los tratamientos FSH 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ más LH 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con o sin eCG el porcentaje de maduración de ovocitos fueron similares ($P > 0.05$). También entre los tratamientos sin uso de FSH, LH con 5 o 15 UI mL⁻¹ de eCG la maduración de ovocitos fueron similares; sin embargo estos tratamientos presentaron menor ($P \leq 0.05$) porcentaje de maduración de ovocitos, respecto al resto de grupos de tratamientos.

El porcentaje de ovocitos con vesícula germinal entre los diferentes grupos de tratamiento fueron similares ($P > 0.05$). Se encontró mayor porcentaje ($P \leq 0.05$) de ovocitos con vesícula germinal rota en los tratamientos FSH 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ más LH 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ más eCG 0 o 5 o 15 UI mL⁻¹, en contraste con el resto de los tratamientos. Entre los tratamientos FSH 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ más LH 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ más eCG 0 o 5 o 15 UI mL⁻¹ el porcentaje de ovocitos con vesícula germinal rota fueron similares ($P > 0.05$), también entre tratamientos con FSH 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ más LH 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ más eCG 0 o 5 o 15 UI mL⁻¹ fueron similares ($P > 0.05$). Los tratamientos FSH 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ más LH 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ más eCG 0 o 5 o 15 UI mL⁻¹ versus FSH 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ más LH 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con o sin eCG son similares ($P > 0.05$) en el porcentaje de metafase I de ovocitos, a su vez, estos últimos son similares a los tratamientos sin FSH, sin LH con o sin eCG. Hubo menor ($P \leq 0.05$) cantidad de ovocitos degenerados en los tratamientos FSH 0.5 o 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ más LH 5 o 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ más eCG 5 o 15 UI mL⁻¹ en comparación con el tratamiento sin FSH, sin LH con o sin eCG.

Tabla 5

Porcentaje de maduración *in vitro* de ovocitos, utilizando diferentes dosis de FSH, LH y eCG en alpacas (réplicas = 5).

Tratamiento			Ovocitos n	Etapa de maduración nuclear				
FSH ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LH ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	eCG (UI mL^{-1})		Número de ovocitos (%)				
				GV	GVBD	MI	MII	DG
0	0	0	71	4 (5.6%)	26 (36.6%) ^a	6 (8.5%) ^a	8 (11.3%) ^a	27 (38.0%) ^a
0	0	5	74	7 (9.5%)	28 (37.8%) ^a	7 (9.5%) ^a	6 (8.1%) ^a	26 (35.1%) ^a
0	0	15	84	4 (4.8%)	33 (39.3%) ^a	8 (9.5%) ^a	7 (8.3%) ^a	32 (38.1%) ^a
0.25	2.5	0	83	6 (7.2%)	20 (24.1%) ^b	11 (13.3%) ^{ab}	34 (41.0%) ^b	12 (14.5%) ^b
0.25	2.5	5	77	7 (9.1%)	18 (23.4%) ^b	10 (13.0%) ^{ab}	33 (42.9%) ^b	9 (11.7%) ^b
0.25	2.5	15	81	6 (7.4%)	16 (19.8%) ^b	11 (13.6%) ^{ab}	38 (46.9%) ^{bc}	10 (12.3%) ^b
0.5	5	0	81	4 (4.9%)	6 (7.4%) ^c	16 (19.8%) ^b	44 (54.3%) ^{cd}	11 (13.6%) ^b
0.5	5	5	85	4 (4.7%)	7 (8.2%) ^c	15 (17.6%) ^b	51 (60.0%) ^d	8 (9.4%) ^b
0.5	5	15	78	6 (7.7%)	6 (7.7%) ^c	14 (17.9%) ^b	46 (59.0%) ^d	6 (7.7%) ^b

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 $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH más $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LH con o sin uso de eCG tuvieron mayores porcentajes (54.3 a 60.0%) de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca en metafase II que el resto de tratamientos que usaron menos dosis de FSH y LH. Estos resultados son similares a los reportes de porcentajes de maduración de ovocitos en metafase II de alpacas: 64.9, 49.2 y 53.8% en cultivo expuesto con FSH por 42 h, 21 h con FSH más 21 h sin FSH y 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 *in vitro* (40); 47.9% con suplemento de FSH durante 20 h completándose las otras 20 h sin FSH (49); 42.9 y 65.8% para 34 y 38 h de maduración con $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH más $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hCG (37); 34.3 y 37.9% para alpacas jóvenes y adultas, 7.7 y 8.5% para ovocitos provenientes de folículos $\geq 2 \text{ mm}$ y $< 2 \text{ mm}$, utilizando $15 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de

FSH, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LH (6). También son similares a los reportes de porcentajes de maduración *in vitro* de ovocitos en llamas: 52%, suplementados con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LH (42); en camellos dromedarios reportaron 61% de maduración de ovocitos en metafase II, suplementado con $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de b-FSH y b-LH (46). Asimismo los resultados del presente experimento son similares a los reportes en bovinos nativos africanos, donde la tasa de maduración de ovocitos fue 60.3% [tratamiento: $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH, 6 mg mL^{-1} de LH y $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de E2] (82); 52.4% para dosis $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Folltropin® de ovocitos bovinos madurados *in vitro* (81).

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 (35). 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 (92).

La FSH podría acelerar la velocidad de maduración *in vitro* de ovocitos de oveja y reducir la tasa de apoptosis, aumentar los niveles de expresión de los mRNAs del RFSH, RLH y RGnRH, y fortalecer las expresiones de proteínas del RFSH y RGnRH (83). La LH redujo la tasa de apoptosis de ovocitos de oveja y las concentraciones de caspasa-3 en fluidos del medio de maduración, adicionalmente, mejoró las expresiones del mRNA de RFSH y RLH de los complejos cúmulo ovocito de oveja; en consecuencia, la LH podría promover la tasa de maduración *in vitro* (84). La FSH y LH suplementadas en medio de maduración *in vitro* podrían promover la velocidad de maduración, reducir la tasa de apoptosis de ovocitos de oveja y aumentar las concentraciones de FSH en el fluido del medio de maduración *in vitro*; además, la FSH y LH potencian los niveles de expresión del mARN de los RFSH, RLH y RGnRH de los complejos cúmulo ovocito de ovejas (87).

La FSH expande el cúmulo del ovocito y aumenta la cantidad del ligando de anfirregulina y epirregulina de una manera dependiente del tiempo y de la dosis de FSH. Esta gonadotropina tiene efectos estimulantes sobre los niveles del mRNA que codifica el receptor de proteína morfogénica ósea 15, y su receptor BMPR1B en las células del cúmulo (100). Los efectos de LH sobre el complejo cúmulo - ovocito están mediados por varios componentes, factor de crecimiento epidérmico, anfirregulina, epirregulina y betacelulina que son secretados por células de la granulosa mural en respuesta a LH y que activan los receptores de EGF en las células del cúmulo (101, 102, 103). Además, la FSH en el proceso de maduración *in vitro* del ovocito, induce la expansión de las células de cúmulo de bovinos a través de la síntesis del piruvato y ácido hialurónico (57). La LH mejora las condiciones de maduración *in vitro* del ovocito, modificando el ambiente nutricional, aumenta la energía disponible para el ovocito; este efecto metabólico se debería al incremento de la glicólisis mediante la oxidación de la glucosa mitocondrial (55). Las gonadotropinas pituitarias y la comunicación local bidireccional entre el ovocito y las células del cúmulo adyacentes son fundamentales para la maduración nuclear y citoplásmica (22).

Probablemente, *in vitro*, la reanudación meiótica de ovocitos hasta llegar a metafase II, se activaría por el aumento del nivel de LH que estarían regulados por sistemas complejos. Los ovocitos se mantienen en detención meiótica debido a altos niveles de cAMP intracelular (7). La reanudación meiótica de los ovocitos, por aumento de LH, potencia el cierre de las uniones Gap, disminuye los niveles de cAMP incrementando la inactivación de PKA. La FSH o ácido araquidónico regulan la proliferación de células somáticas y la detención meiótica de ovocitos en el folículo inmaduro a través de vías de cAMP / PKA; por otro lado, la reanudación meiótica del ovocito se activan tanto por la LH como por ácido araquidónico a través de las rutas de cAMP / PKC; las prostaglandinas se producen rutinariamente en ambas vías, que promueven diferentes actividades celulares en ovocitos inmaduros y maduros debido a su interacción distinta con los receptores de prostaglandina E (28).

Los resultados de los tratamientos $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH más $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LH con o sin eCG, encontrados en el presente estudio sobre maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca en metafase II (54.3 a 60.0%) son mayores que los resultados informados por Del Campo *et al.* (41), quienes reportaron 30.4% de maduración *in vitro* de ovocitos de llamas en metafase II, a 30 h de cultivo, suplementados con $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LH.

La maduración de ovocitos *in vitro* de bovinos nativos africanos, reportada por Lekola *et al.* (82), afirman alcanzar 16% de tasa de maduración de ovocitos, a 24 h de maduración en el que utilizaron $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH, 5 mg mL^{-1} de LH y $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de E2. En ovinos Wei *et al.* (83) encontraron tasas de maduración de ovocitos 38.7, 43.5% para 0, 5 UI mL^{-1} de FSH. En otro estudio en ovejas, Wei *et al.* (84) reportaron tasas de maduración ovocitaria de 35.2, 38.2% para 0, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de LH; 48.5% para 10 UI mL^{-1} de FSH. De la misma forma en ovejas Tan, Yang *et al.* (86) reportaron 35.4% (0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FSH); 41.6% (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FSH); 35.4% (0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ LH) 37.8% (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ LH) de maduración *in vitro* de ovocitos. En un estudio reciente en ovejas, Wei *et al.* (87) informaron porcentajes de maduración *in vitro* de ovocitos de ovejas 38.7% (sin LH, sin FSH); 43.5% (5 IU mL^{-1} FSH); 38.2% (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ LH).

Los mayores porcentajes de maduración *in vitro* de ovocitos de alpacas encontrados en el presente estudio frente a otros, probablemente se atribuyan a la composición del medio de maduración, dado que en el presente experimento el medio se suplementó con cisteína, glutamina y EGF. Considerando, las diferencias entre los diferentes medios de cultivo pueden atribuirse a la composición de los medios, así como las diferencias en su concentración iónica (79); la composición de los medios utilizados para la maduración de ovocitos *in vitro* juega un papel integral en la competencia de desarrollo del ovocito (6). Se informó que la adición de cisteína 0.3 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 (104). Las células del cúmulo durante la maduración *in vitro* juegan un papel importante en la síntesis de glutatión en los ovocitos, permitiendo que los ovocitos usen cistina y contribuyan al efecto estimulante ejercido por la cisteína y la cisteamina. El medio de maduración *in vitro* suplementado con cisteína o cisteamina aumenta el contenido de glutatión en ovocitos sin masa del cúmulo y en ausencia de una monocapa de células del cúmulo (105). La cisteamina mejora significativamente las tasas de maduración en metafase II cuando fueron cultivados en medio con E2 y baja concentración de FSH o sin FSH; también la maduración citoplasmática es promovido con la adición de cisteamina en el medio (106). 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*. El mecanismo más probable sobre el aumento del metabolismo

de glutamina dentro del ovocito después de maduración *in vitro* es que aumenta la concentración de piruvato y posteriormente hay mayor metabolismo de glutamina dentro del ovocito (107). 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 (108). La FSH estimula la expresión de factores similares al EGF en las células del cúmulo bovino y receptores de factores secretados por ovocitos en células del cúmulo durante la maduración *in vitro* (100). El efecto estimulante del EGF es un factor importante en la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos, cuya estimulación en ovocitos podría influir en la transducción e interacción de señales intracelulares (108).

Las mejores tasas de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca en metafase II (54.3 a 60.0%) encontrados en el presente estudio, correspondiente a los tratamientos $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH más $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LH con o sin eCG, 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] (78); 68.5 y 75.3% para 38 y 42 h de maduración, en el que utilizaron $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hCG (39); 65.1% después de 32 h de cultivo, al suplementar con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH, (38); 82 y 64% de ovocitos procedentes de alpacas con superestimulación ovárica con FSH y eCG y madurados con $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ FSH (36). 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 $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH (44); 70.2 y 70.5% para 36 y 42 h de maduración, en el que suplementaron con 0.02 unidades mL^{-1} de FSH (45); 77% para ovocitos recuperados por laparatomía, madurados durante 30 h suplementado con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LH (43).

Comparados con ovocitos de otros rumiantes donde usaron gonadotropinas en maduración *in vitro*, las tasas de maduración del presente estudio también fueron inferiores, en comparación a los reportes en bovinos: 88.4; 93.4; 80.7; 80.9; 82; 81.7; 14.2% para las combinaciones comerciales de gonadotropinas Repronex + Follism; Menupur + Follism; Repronex + Bravelle; Menupur + Bravelle; Repronex + Gonal-F; Menupur + Gonal-F; grupo testigo (CG), respectivamente, en el que usaron 40 IU mL^{-1} de gonadotropinas para cualquier combinación (47); 92.4% (FSH: $50 \mu\text{g mL}^{-1}$; LH: $150 \mu\text{g mL}^{-1}$) de ovocitos bovinos madurados durante 24 h (80). En ovinos encontraron 91.9% [r-FSH: 0.1 UI mL^{-1} + r-LH: 0.1 UI mL^{-1}]; 84% (gonadotropinas hipofisarias, hG) (85).

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, similar al que usó Del Campo *et al.* (41), quienes reportaron bajas tasas de maduración de ovocitos de llamas (30.4%). También al utilizar baja dosis de gonadotropinas $15 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de FSH más $1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de LH, Leisinger *et al.* (6) reportaron bajas tasas de maduración de ovocitos de alpaca (34.3 y 37.9% para alpacas jóvenes y adultas). Sin embargo, se reportan altas tasas de maduración de ovocitos cuando utilizaron mayor dosis de gonadotropinas $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH más $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LH: 77% (43). Aunque, al suplementar con FSH $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, obtuvieron 65.1% (38). También, obtuvieron altas tasas de maduración 82 y 64% cuando los ovocitos procedieron de alpacas con superestimulación ovárica con FSH y eCG, aquí utilizaron $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH en el medio de maduración *in vitro* (36). La superestimulación podría favorecer la mayor tasa de maduración de ovocitos debido probablemente a la pre estimulación con gonadotropinas para el reinicio de la meiosis ovocitaria, dado que se informó tasas de maduración del 100% de ovocitos de cabras superestimuladas (109). En combinación con análogos de hormonas como hCG obtuvieron 68.5 y 75.3% de tasa de maduración *in vitro* de ovocitos, al usar $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hCG (39). Fue demostrado que la LH o FSH sola o en combinación, induce altas tasas de maduración de ovocitos bovinos *in vitro* (80). Actualmente, se usan diferentes combinaciones de gonadotropinas y/o hCG en un intento de mejorar la maduración *in vitro* de los ovocitos. 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 (47). Por las consideraciones anteriores, las diversas dosis de gonadotropinas tendrían efecto variable en la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca, por tanto la concentración de gonadotropinas afectaría las expresiones de mANRs de los receptores de FSH y LH en el complejo cúmulo ovocito, que desencadenaría las vías que favorecerían el reinicio de la meiosis hasta la progresión a metafase II del ovocito.

Otros factores que podrían haber influido en bajas tasas de maduración de ovocitos encontradas en el presente estudio, en comparación con altas tasas reportadas en otros estudios, sería el ambiente de cultivo de ovocitos, dado que en otras investigaciones utilizaron 5% de oxígeno, 5% de 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 CO₂ a 38.5 °C, similar a los reportes de Leisinger *et al.* (6), quienes usaron 6% de CO₂, 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 (38). Los ovarios utilizados en este estudio fueron ovarios con o sin cuerpo lúteo, este factor fisiológico podría haber influido en las bajas tasas de maduración de ovocitos; sin embargo, otros estudios comparados no precisan si utilizaron ovarios en fase progestacional o estrogénica.

En el presente experimento, el efecto de la eCG no fue significativo ($P > 0.05$), al utilizar 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH más 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de LH más 5 o 15 UI mL^{-1} de eCG sobre el porcentaje de ovocitos de alpaca madurados *in vitro*. Se obtuvo porcentajes similares ($P > 0.05$) de ovocitos madurados a dosis 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH más 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de LH más 5 o 15 UI mL^{-1} de eCG versus dosis 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH más 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de LH sin eCG. Sin embargo, los tratamientos con dosis 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH más 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de LH más 15 UI mL^{-1} de eCG fueron similares ($P > 0.05$) con el tratamiento 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH más 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sin eCG. Entre los tratamientos 5 o 15 UI mL^{-1} de eCG sin FSH sin LH no hubo diferencia ($P > 0.05$) en el porcentaje de ovocitos madurados. Por tanto, el uso de eCG sin FSH o LH no tuvo efecto ($P > 0.05$) favorable en la maduración de ovocitos de alpaca.

Los resultados del presente experimento (41.0 a 46.9%) con enfoque al efecto de eCG de los grupos de tratamiento dosis 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH más 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de LH más 0 o 5 o 15 UI mL^{-1} de eCG son similares a los resultados de Wei *et al.* (63) quienes 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 mL^{-1}) de maduración *in vitro* de ovocitos de oveja por grupo de tratamiento, respectivamente. También en cabras, la suplementación de 20 UI 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* (88). Asimismo, reportaron 89.3% de maduración de ovocitos bovinos al utilizar 250 UI de eCG y hCG mL^{-1} con hipotaurina/taurina en medio de maduración *in vitro* (64).

El uso de eCG a una concentración de 15 UI más 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH y 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de LH, encontrados en el presente experimento, tiene el mismo efecto de 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de

FSH más $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LH sin eCG, sobre la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca. La probable explicación sería que la eCG como ocurre en ovocitos de oveja donde mejora la maduración y disminuye la apoptosis de ovocitos sometidos a maduración *in vitro*, aumenta la expresión de RFSH, RLH y RGnRH, dicha expresión aumentada puede facilitar la maduración *in vitro* de ovocitos; cuya dosis óptima sería 20 UI mL^{-1} de eCG (63). Sin embargo, la eficacia real de la eCG durante la maduración *in vitro* de ovocitos aún debe examinarse en detalle. Se debe considerar además que 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 (58). También, se cree que el efecto beneficioso de la eCG sobre la maduración nuclear de los ovocitos caninos se debe a la actividad de FSH, ya que se ha demostrado que la FSH induce la reanudación de la meiosis (89, 110).

Todavía no están claros los factores que afectan la maduración *in vitro* de ovocitos de alpacas. Las condiciones *in vitro* utilizadas para madurar al ovocito de alpaca son subóptimas y que se necesita más investigación para mejorar los protocolos de maduración *in vitro* para esta especie (38). Parece que varios factores o condiciones durante la maduración *in vitro* de ovocitos de camélidos, deben mejorarse para obtener resultados similares como los informados en otros rumiantes (111).

4.2. Clivaje de embriones después de la maduración *in vitro* de ovocitos donde se utilizó diferentes dosis de gonadotropinas

La estructura morfológica de los embriones se observaron mediante estereomicroscopio a 4x, con enfoque al ooplasma donde se observaron la presencia de blastómeros de dos a ocho células, cuando presentó esta característica se consideró que hubo división embrionaria (Figura 7).



Figura 7. Embrión de alpaca de cuatro células, observado con microscopio a objetivo 100 x.

De un total de 1570 ovocitos de alpaca sometidos a fertilización, 1436 presuntos cigotos fueron cultivados *in vitro*. Los resultados de la división embrionaria temprana, se muestran en la Tabla 6, expresada como tasa de clivaje. Se encontró mayor ($P \leq 0.05$) tasa de clivaje de embriones en los tratamientos FSH $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ más LH $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ más eCG 5 o 15 UI mL^{-1} , versus FSH $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ más LH $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ sin eCG y los tratamientos sin FSH, sin LH, con o sin eCG. Los tratamientos FSH $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ más LH $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ sin eCG, versus FSH $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ más LH $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ más eCG 5 o 15 UI mL^{-1} fueron similares ($P > 0.05$). Entre los tratamientos FSH $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ más LH $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ más eCG 0 o 5 o 15 UI mL^{-1} los porcentajes de clivaje fueron similares ($P > 0.05$). Se encontró menores ($P \leq 0.05$) tasas de clivaje de embriones en los tratamientos FSH $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ más LH $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ más eCG 0 o 5 o 15 mL^{-1} que el resto de tratamientos.

Tabla 6

División embrionaria (clivaje) a 48 h, después de la maduración in vitro (con diferentes concentraciones de gonadotropinas) de ovocitos de alpaca.

Tratamiento			Réplica	Presuntos cigotos n	Clivaje	
FSH ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LH ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	eCG (UI mL ⁻¹)			Número de embriones (%)	
0	0	0	5	152	6 (3.9%) ^a	
0	0	5	5	157	7 (4.5%) ^a	
0	0	15	5	171	7 (4.1%) ^a	
0.25	2.5	0	5	163	29 (17.8%) ^b	
0.25	2.5	5	5	152	32 (21.1%) ^{b,c}	
0.25	2.5	15	5	156	35 (22.4%) ^{b,c}	
0.5	5	0	5	172	47 (27.3%) ^{b,c}	
0.5	5	5	5	169	50 (29.6%) ^c	
0.5	5	15	5	144	44 (30.6%) ^c	

Superíndices de letras diferentes dentro de la misma columna expresan diferencia ($P \leq 0.05$).

Las mayores tasas de clivaje de 2 a 8 células (29.6 y 30.6%) correspondiente a tratamientos FSH 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ más LH 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ más eCG 0 5 o 15 UI mL⁻¹, encontrados en el presente estudio, son similares a los informes de Condori *et al.* (40), 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.* (112) 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. En otro experimento, la tasa de clivaje en llamas para el tratamiento con medio de cultivo CR1aa fue 32%, en la maduración de ovocitos de llama utilizaron FSH 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ más LH 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a estos ovocitos maduros en el cultivo se les colocó fibroblastos de llama (42).

Las tasas de clivaje utilizando diferentes dosis de FSH, LH con o sin eCG, encontradas en el presente experimento son mayores a los reportes en alpacas por Huanca *et al.* (37), quienes reportan 7.7 y 15.4% de clivaje procedentes de ovocitos de alpaca madurados *in vitro* durante 34 y 38 h en medio suplementado con $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hCG. En otro reporte a las 72 h de cultivo de embriones, las tasas de clivaje fueron 8.1, 15.6 y 19.8% para 34, 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 (39). En llamas, el primer reporte de embriones producidos *in vitro* fue informado por Del Campo *et al.* (41), quienes reportaron 15.8% de división de células embrionarias (2 a 16 células). Donnay y Verhaeghe (113) reportaron 21.5% de blastocistos bovinos en el día 7 cultivados en medio SOF, en la maduración de ovocitos utilizaron 10 UI mL^{-1} de eCG, 5 UI mL^{-1} de hCG.

Otras investigaciones en alpacas, reportan altas tasas de clivaje en comparación con los resultados del presente estudio que fueron bajas. Huanca *et al.* (50), a 72 h de cultivo con KSOM, encontraron tasas de clivaje de 45.2 y 42.1% correspondiente a ovocitos de alpacas superovulados con FSH y eCG, madurados *in vitro* con $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hCG. De forma similar, Arriaga *et al.* (49) al suplementar el medio de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca con FSH durante 20 h completando las otras 20 h sin FSH, encontraron 46.2% de tasa de división embrionaria. También, Ruiz *et al.* (38) 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. Huanca *et al.* (50) luego de cultivar presuntos cigotos de alpaca con medio KSOM durante 72 h, reportaron 45.2 y 42.1% de tasas de clivaje para ovocitos recuperados de alpacas superovuladas con FSH y eCG. En llamas, Ayuque *et al.* (45) reportaron tasas de clivaje de 51 y 49.6% correspondiente a 36 y 42 h de maduración *in vitro* de ovocitos de llama. En camellos dromedarios, obtuvieron 64% de tasa de clivaje (2 a 8 células) cultivadas con mKSOMaa, en la maduración *in vitro* de ovocitos suplementaron con $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH (114).

Las tasas de clivaje encontradas en el presente experimento son menores frente a otros estudios de embriones cultivados *in vitro* donde utilizaron gonadotropinas en medio de maduración de ovocitos. En bovinos, reportaron (porcentaje de clivaje [tratamiento]): 53.3% ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ FSH + $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ LH); 19.4% (sin hormonas), evaluados el día tres en división de 2 a 8 células (80); 67.6% (sin gonadotropinas) 82.7% (1 ng mL^{-1} FSH y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ LH); 84.3% [1 ng mL^{-1} FSH y $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ LH] (115); 40% (Repronex + Bravelle); 50% (Menupur + Bravelle); 41.5% (Repronex + Gonal-F) en todas las

combinaciones usaron 40 IU mL⁻¹ de gonadotropinas en la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos (47); 81.4% (0.1 UI mL⁻¹ rFSH, 0.1 UI mL⁻¹ rLH); 36.7% (Sin gonadotropinas) (85); 40 a 45% [250 UI mL⁻¹ eCG y hCG] (64); en ovinos, reportaron 59.7% (10 µg mL⁻¹ FSH) (116). La adición de eCG durante la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca encontrado en este estudio probablemente ayude mejorar las tasas de clivaje de embriones. En el informe de Donnay y Verhaeghe (113) reportaron 21.5% de blastocistos bovinos en el día 7 cultivados en medio SOF, en la maduración de ovocitos utilizaron 10 UI mL⁻¹ de eCG más 5 UI mL⁻¹ de hCG.

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 todo 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. Sin embargo, ni la técnica de selección de espermatozoides (Swim-up vs Percoll gradiente) ni la tensión de oxígeno (20 vs 5%) durante el cultivo de embriones influyeron en la tasa de formación de blastocistos durante la producción *in vitro* de embriones de alpaca (38). Los resultados encontrados de clivaje de embriones en alpacas respecto a camellos son bajos, posiblemente se deben a posibles deficiencias en la implementación de la técnica, especialmente en las condiciones de fecundación y cultivo posfecundación (39). Las diferencias entre los diversos medios de cultivo pueden atribuirse a la composición de los medios a las diferencias en su concentración iónica (79). Los resultados bajos o altos en procesos de fertilización *in vitro* de ovocitos de alpaca, posiblemente podrían estar relacionados con las condiciones nutricionales, corporales y de manejo de alpacas (38). Varios factores o condiciones durante la maduración *in vitro*, la fecundación *in vitro* y el cultivo de embriones de

camélidos deben mejorarse para obtener resultados consistentes como los informados en otros rumiantes (111). Las condiciones óptimas para maduración y fertilización *in vitro* aún deben determinarse (41).

CONCLUSIONES

- Las gonadotropinas influyen en la maduración nuclear en metafase II de ovocitos de alpaca, los mayores porcentajes se obtuvieron al suplementar en medio de maduración *in vitro*, con concentraciones de $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH más $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LH más eCG 5 o 15 UI mL^{-1} .
- Las gonadotropinas influyen en el clivaje de embriones de alpaca, las mayores tasas de clivaje procedieron de ovocitos madurados *in vitro* suplementados con dosis de $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de FSH más $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LH más eCG 5 o 15 UI mL^{-1} .

RECOMENDACIONES

- Se sugiere suplementar al medio de maduración mínimamente con concentraciones de FSH $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ más LH $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para fertilización *in vitro* de ovocitos de alpaca.
- Se recomienda realizar más estudios sobre el uso combinado de hormonas FSH, LH, eCG, hCG, GH con diferentes dosis durante la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca.
- Se propone estudiar molecularmente la acción de las gonadotropinas en procesos de maduración, fertilización de ovocitos y cultivo *in vitro* de embriones de alpaca.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sumar J. Demographics and Herd Management Practices in South America. In: Youngquist R, Threlfall WR, editors. Current therapy in Large Animal Theriogenology. United States of America: Elsevier; 2007. p. 845–850.
2. Aba MA. Anatomy and Physiology of Reproduction in the Female Llama and Alpaca. In: Llama and Alpaca Care [Internet]. Elsevier Inc.; 2014. p. 140–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4377-2352-6.00014-6>
3. Miragaya MH, Chaves MG, Agüero A. Reproductive biotechnology in South American camelids. Small Rumin Res [Internet]. 2006 Feb [cited 2015 Mar 5];61(2–3):299–310. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448805002580>
4. Brown BW. A review on reproduction in South American camelids. Anim Reprod Sci. 2000;58(3–4):169–95.
5. Tibary A, Anouassi A, Khatir H. Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids. Theriogenology [Internet]. 2005 Aug [cited 2015 Mar 5];64(3):618–38. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X05001779>
6. Leisinger C, Coffman E, Coutinho da Silva M, Forshey B, Pinto C. Factors affecting in vitro maturation of alpaca (*Lama paco*) oocytes. Anim Reprod Sci [Internet]. 2014 Nov 10 [cited 2015 Mar 5];150(1–2):70–5. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432014002759>
7. Sánchez F, Smitz J. Molecular control of oogenesis. Biochim Biophys Acta [Internet]. 2012;1822(12):1896–912. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbdis.2012.05.013>
8. Pepling M. Oocyte Development before and during Folliculogenesis. In: Krisher RL, editor. Oocyte Physiology and Development in Domestic Animals. First Edit. USA: Wiley-Blackwell; 2013. p. 1–14.
9. Sirard MA, Assidi M. Screening for Oocyte Competence. In: Krisher RL, editor. Oocyte Physiology and Development. First. USA: Wiley-Blackwell; 2013. p. 191–206.
10. Ying Y, Zhao GQ. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic

- ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol.* 2001;232(2):484–92.
11. Norris RP, Ratzan WJ, Freudzon M, Mehlmann LM, Krall J, Movsesian MA, et al. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development* [Internet]. 2009;136(11):1869–78. Available from: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.035238>
 12. Bevers MM, Dieleman SJ, van den Hurk R, Izadyar F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology.* 1997;(47):13–22.
 13. Sánchez-Aparicio P, Ramos R, Cuadros J, Hernández E. Moléculas de interacción célula-célula y célula-MEC implicadas en foliculogénesis Cell-cell and cell-ECM interaction molecules involved in folliculogenesis. *Rev Iberoam Fertil.* 2007;24:37–44.
 14. Demeestere I, Streiff AK, Suzuki J, Al-Khabouri S, Mahrous E, Tan SL, et al. Follicle-Stimulating Hormone Accelerates Mouse Oocyte Development In Vivo. *Biol Reprod* [Internet]. 2012;87(1):1–11. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.112.099929>
 15. Adams GP, Sumar J, Ginther OJ. Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *J Reprod Fertil.* 1990;90:535–45.
 16. Marai I, el Enany T, Abdine A. Prenatal development of adenohipophyseal cell types, ovary, and uterus of dromedary camel. *Arch Exp Vet* [Internet]. 1990;44(4):581–9. Available from: <http://europepmc.org/abstract/med/2241496>
 17. Vaughan J. Ovarian function in South American camelids (alpacas , llamas , vicunas , guanacos). *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2011;124(3–4):237–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.031>
 18. Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci.* 2005;118(22):5257–68.
 19. Juengel J, McNatty K. The role of proteins of the transforming growth factor- b superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod Update.* 2005;11(2):144–61.
 20. Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, et al. Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod.* 2004;70:900–9.
 21. Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. Expression of Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Receptor Messenger Ribonucleic Acids in Bovine Follicles during the First Follicular Wave. *Biol Reprod.* 1995;53(4):951–7.

22. Lonergan P, Fair T. Maturation of Oocytes in Vitro. *Annu Rev Anim Biosci* [Internet]. 2016;4(1):255–68. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-animal-022114-110822>
23. Farsi MM, Kamali N, Pourghasem M. Embryological aspects of oocyte in vitro maturation. *Int J Mol Cell Med* [Internet]. 2013;2(3):99–109. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3920538&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
24. Thomas FH, Vanderhyden BC. Oocyte growth and developmental competence. In: Gardner DK, Gervis J, Shoham Z, editors. *In-vitro maturation of human oocytes* [Internet]. Taylor & Francis Group; 2006. p. 1–14. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472648310605111>
25. Elder K, Dale B. *In vitro fertilization*. Second edi. New York, USA: Cambridge University Press; 2000. 310 p.
26. Sen A, Caiazza F. Oocyte Maturation: A story of arrest and release. *Front Biosci* [Internet]. 2013;1(5):451–77. Available from: <https://www.bioscience.org/2013/v5s/af/383/fulltext.php?bframe=PDFII>
27. Luciano A, Sirard M. Successful in vitro maturation of oocytes: a matter of follicular differentiation. *Biol Reprod*. 2017;98(2):162–9.
28. Khajeh M, Rahbarghazi R, Nouri M. Potential role of polyunsaturated fatty acids , with particular regard to the signaling pathways of arachidonic acid and its derivatives in the process of maturation of the oocytes : Contemporary review. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2017;94:458–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.140>
29. Shimada M, Terada T. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. *Mol Hum Reprod*. 2002;8(7):612–8.
30. Adhikari D, Liu K. The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2014;382(1):480–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.07.027>
31. Tosti E. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006;4:26.
32. Trasorras VL, Giuliano SM, Miragaya MH. Embryo Preservation and in Vitro Production of Embryos [Internet]. *Llama and Alpaca Care: Medicine, Surgery, Reproduction, Nutrition, and Herd Health: First Edition*. Elsevier Inc.; 2013. 322-327 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4377-2352-6.00029-8>
33. Hawk HW, Wall RJ. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro produced oocytes . I. selection of oocyte and zygotes. *Theriogenology*. 1994;41(8):1571–83.
34. De Loos F, Van Vliet C, Van Maurik P, Kruip TA. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res*. 1989;24:197–204.

35. Chian R, Buckett WM, Tan S-L. Review In-vitro maturation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2003;8(2):148–66. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60511-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60511-1)
36. Ratto M, Gomez C, Berland M, Adams GP. Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2007 Feb [cited 2015 Mar 5];97(3–4):246–56. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843200600042X>
37. Huanca W, Condori R, Cainzos J, Chileno M, Quintela L, Becerra J, et al. In vitro maturation and in vitro fertilization of alpaca (*Vicugna pacos*) oocytes: effect of time of incubation on nuclear maturation and cleavage. *Reprod Fertil Dev*. 2010;22(1):327.
38. Ruiz J, Paulo Santayana R, José Mendoza M, Leandra Landeo J, Huamán E, Ticllacuri F, et al. Effect of oocyte maturation time, sperm selection method and oxygen tension on in vitro embryo development in alpacas. *Theriogenology* [Internet]. 2017;95:127–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.006>
39. Huanca L. W, Condori P. R, Chileno M. M, García H. P, Cainzo C. J, Becerra G. JJ. Evaluacion de cuatro tiempos de cultivo sobre la tasa de maduración y división posfecundación in vitro de ovocitos de alpaca. *Rev Investig Vet del Peru*. 2014;25(4):468–76.
40. Condori RL, Huanca W, Chileno M, Cainzo J, Valverde F, J. BJ, et al. Effect of follicle-stimulating hormone addition on in vitro maturation and cleavage of alpaca (*Vicugna pacos*) embryos. *Reprod Fertil Dev*. 2010;23(1):224.
41. Del Campo M, Del Campo C, Donoso M, Berland M, Mapletoft R. In vitro fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology* [Internet]. 1994 Jan [cited 2015 Mar 5];41(6):1219–29. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X94904793>
42. Sansinena MJ, Taylor SA, Taylor PJ, Denniston RS, Godke RA. Production of Nuclear Transfer Llama (*Lama glama*) Embryos from *In Vitro* Matured Llama Oocytes. *Cloning Stem Cells* [Internet]. 2003;5(3):191–8. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/153623003769645857>
43. Sansinena MJ, Taylor SA, Taylor PJ, Schmidt EE, Denniston RS, Godke RA. In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Anim Reprod Sci*. 2007;99(3–4):342–53.
44. Ratto M, Berland M, Huanca W, Singh J, Adams GP. In vitro and in vivo maturation of llama oocytes. *Theriogenology* [Internet]. 2005 Jun [cited 2015 Mar 5];63(9):2445–57. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X04003784>
45. Ayuque A, Justiniano E, Mendoza J, Landeo L, Ruiz J. Efecto del tiempo de maduración in vitro en la capacidad meiótica y desarrollo de embriones de llama.

- Spermova. 2014;2(1):99–101.
46. Nowshari MA. The effect of harvesting technique on efficiency of oocyte collection and different maturation media on the nuclear maturation of oocytes in camels (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology* [Internet]. 2005 Jun [cited 2015 Mar 5];63(9):2471–81. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X04003887>
 47. Wang X, Tsai T, Qiao J, Zhang Z, Feng HL. Impact of gonadotropins on oocyte maturation, fertilisation and developmental competence in vitro. *Reprod Fertil Dev* [Internet]. 2013;26:752–7. Available from: <http://www.publish.csiro.au/?paper=RD13024>
 48. Holm P, Callesen H. In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod Nutr Dev*. 1998;38(6):579–94.
 49. Arriaga C I, Huanca L W, Terreros C M, Becerra G JJ, García H P, Ampuero B A. Efecto de Temperatura y Tiempo de Almacenamiento de Ovarios de Alpacas sobre la Tasa de Maduración y división in vitro de Ovocitos. *Rev Investig Vet del Perú*. 2014;25(4):477–86.
 50. Huanca W, Condori RL, Chileno MA, Cainzos J, Becerra JJ, A QL, et al. In vivo maturation and in vitro fertilization of alpaca oocytes. *Reprod Fertil Dev*. 2010;23(1):204–5.
 51. Gordon I. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. 2nd ed. UK: CABI Publishing; 2003. 548 p.
 52. Thompson JG, Mottershead DG, Gilchrist RB. Oocyte-Secreted Factors in Domestic Animals. In: Krisher RL, editor. *Oocyte Physiology and Development in Domestic Animals*. First. USA: Wiley-Blackwell; 2013. p. 55–70.
 53. Trounson A, Wood C, Kausche A. In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* [Internet]. 1994;62(2):353–62. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)56891-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(16)56891-5)
 54. Morgan P, Warikoo P, Bavister B. In Vitro Maturation Assessment of Ovarian Oocytes from Unstimulated of Cytoplasmic Maturity By Embryonic after In Vitro Fertilization. *Biol Reprod*. 1991;45(1):89–93.
 55. Zuelke KA, Brackett BG. Luteinizing Hormone-Enhanced in Vitro Maturation of Bovine Oocytes with and without Protein Supplementation. *Biol Reprod*. 1990;43:784–7.
 56. Anderiesz C, Ferraretti A, Magli C, Fiorentino A, Fortini D, Gianaroli L, et al. Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development in vitro. *Hum Reprod*. 2000;15(5):1140–8.
 57. Fenton SE, Dentine MR, Ax RL. Modulation of bovine oocyte-cumulus cell

- complex maturation and fertilization in vitro by glycosaminoglycans. *J Dairy Sci* [Internet]. 1993;76(3):701–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8385162>
58. Murphy BD, Martinuk SD. Equine Chorionic Gonadotropin. *Endocr Rev.* 1991;12(1):27–44.
 59. Hoppen HO. The equine placenta and equine chorionic gonadotrophin - an overview. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1994;102(3):235–43.
 60. Brendemuehl JP, Carson RL, Wenzel JGW, Boosinger TR, Shelby RA. Effects of grazing endophyte-infected tall fescue on eCG and progesterone concentrations from gestation days 21 to 300 in the mare. *Theriogenology.* 1996;46(1):85–95.
 61. Sugino H, Bousfield GR, Moore WT, Ward DN. Structural studies on equine glycoprotein hormones. Amino acid sequence of equine chorionic gonadotropin β -subunit. *J Biol Chem.* 1987;262(18):8603–9.
 62. Martinuk SD, Manning AW, Black WD, Murphy BD. Effects of Carbohydrates on the Chorionic Pharmacokinetics Gonadotropin and Biological Activity of Equine Chorionic Gonadotropin In Vivo. *Biol Reprod.* 1991;45:598–604.
 63. Wei SC, Gong ZD, Zhao HW, Liang HQ, Lai LJ, Deng YY. Equine chorionic gonadotropin influence on sheep oocyte in vitro maturation , apoptosis , and follicle-stimulating hormone receptor and luteinizing hormone receptor expression. *Genet Mol Res.* 2016;15(4):1–13.
 64. Park JL, Jang Y. Assessment of nuclear status of activated bovine oocytes matured in different maturation conditions in vitro. *Reprod Fertil Dev.* 2005;17:285.
 65. Wongsrikeao P, Karja NWK, Budiyo A, Mtango NR, Murakami M, Nii M, et al. Meiotic competence and dna fragmentation of porcine oocytes from ovaries stored in various temperatures. *Reprod Fertil Dev.* 2004;12(2):283–4.
 66. Palma G. *Biología de la Reproducción.* Segunda Ed. Mar del Plata, Argentina: Ediciones Reprobio; 2008. 669 p.
 67. Witte TS, Schäfer-Somi S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2007;102(3–4):181–93.
 68. Fraser LR. Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod.* 1998;13 Suppl 1:9–19.
 69. Martinez E, Ruiz S, Roca J, Vazquez JM. Fecundación “in vitro” en los animales de granja [Internet]. Universidad de Murcia. Secretariado de Publicaciones e Intercambio Científico.; 1989. 60 p. Available from: <http://www.worldcat.org/title/fecundacion-in-vitro-en-los-animales-de-granja/oclc/26327967>
 70. Cross NL. Role of Cholesterol in Sperm Capacitation. *Biol Reprod.* 1998;59:7–11.

71. Parrish JJ. Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology* [Internet]. 2014;81(1):67–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.005>
72. Gonçalves FS, Barretto LSS, Arruda RP, Perri SHV, Mingoti GZ. Heparin and penicillamine-hypotaurine-epinephrine (PHE) solution during bovine in vitro fertilization procedures impair the quality of spermatozoa but improve normal oocyte fecundation and early embryonic development. *Vitr Cell Dev Biol - Anim.* 2014;50(1):39–47.
73. Meizel S, Working PK. Further evidence suggesting the hormonal stimulation of hamster sperm acrosome reactions by catecholamines in vitro. *Biol Reprod* [Internet]. 1980;22(2):211–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7378531>
74. Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol.* 2001;3(2):E59–64.
75. Wani NA. In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. *Small Rumin Res* [Internet]. 2002 May [cited 2015 Mar 8];44(2):89–95. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448802000202>
76. Mucci N, Aller JF, Kaiser GG, Hozbor F, Alberio RH. Producción in vitro de embriones bovinos: Suplementación de los medios de cultivo con suero. *Arch Med Vet.* 2006;38(2):97–104.
77. Bó GA, Mapletoft RJ. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim Reprod.* 2013;10(3):344–8.
78. Pacompia T MH. Efecto de las gonadotropinas en la maduración y fertilización de ovocitos en alpacas (*Vicugna pacos*) [Internet]. Universidad Nacional del Altiplano-Puno; 2017. Available from: http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/2816/Luna_Mamani_Elizabeth.pdf?sequence=1
79. Farag IM, Girgis SM, Zowail ME, Abd El-Hafez MAM. In vitro maturation of camel (*Camelus dromedarius*) cumulus-denuded oocytes. *World Appl Sci J.* 2013;26(3):352–9.
80. Salgado R, Vergara Ó, Ramírez L. Effect of gonadotropins on the maturation and embryo development of bovine oocytes cultured in vitro. *Rev MVZ Córdoba.* 2010;15(1):1954–60.
81. Valéria de Oliveira Santos M, Bento de Queiroz Neta L, Azevedo Borges A, Fernandes Pereira A. Influence of commercially available follicle stimulating hormone on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Semin Ciências Agrárias.* 2017;38(3):1393–402.
82. Lekola KPM, Ng'ambi JW, Nkadameng N, Mphaphathi ML, Nedambale TL. Effect of different concentrations of LH, FSH, and E2 on the maturational rate of indigenous south african cattle oocytes selected by brilliant cresyl blue staining. *Reprod Fertil Dev.* 2014;27(1):235–6.

83. Wei S, Zhuandi G, Li S, Haoqin L, Luju L, Yingying D. Maturation rates of oocytes and levels of FSHR, LHR and GnRHR of COCs response to FSH concentrations in IVM media for sheep. *J Appl Biomed* [Internet]. 2017;15(3):180–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jab.2017.01.001>
84. Wei SC, Deng YY, Lai LJ, Liang HQ, Lin GZ, Gong ZD. Evaluation of luteinizing hormone regulation of maturation and apoptosis , expression of LHR and FSHR in cumulus-oocyte complexes in Lanzhou fat- tailed sheep. *Pol J Vet Sci*. 2017;20(4):759–68.
85. Accardo C, Dattena M, Pilichi S, Mara L, Chessa B, Cappai P. Effect of recombinant human FSH and LH on in vitro maturation of sheep oocytes; embryo development and viability. *Anim Reprod Sci*. 2004;80(1–2):77–86.
86. Yang S, Li Y, Zhang Y. In vitro Maturation of Tan Sheep Oocytes. *Agric Sci Technol*. 2015;16(9):1865–8.
87. Wei S, Deng Y, Lai L, Liang H, Gong Z. 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. *S Afr J Anim Sci*. 2018;48(2):369–78.
88. Kouamo J, Drinker Kharche S. FSH and LH can be substituted by eCG in maturation media for caprine embryo or parthenote production in vitro. *J Vet Sci Technol* [Internet]. 2017;08(04 (Suppl)):123. Available from: <https://www.omicsonline.org/conference-proceedings/veterinary-2017-posters-accepted-abstracts.digital>
89. Songsasen N, Yu I, Gomez M, Leibo SP. Effects of meiosis-inhibiting agents and equine chorionic gonadotropin on nuclear maturation of canine oocytes. *Mol Reprod Dev*. 2003;65(4):435–45.
90. Ruiz J, Landeo L, Mendoza J, Artica M, Correa JE, Silva M, et al. Vitrification of in vitro mature alpaca oocyte: effect of ethylene glycol concentration and time of exposure in the equilibration and vitrification solutions. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2013 Dec [cited 2015 Feb 2];143(1–4):72–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432013003059>
91. Galli C, Moor RM. Gonadotrophin Requieriments for the In Vitro Maturation of Sheep and Their Subsequent Embryonic Development. *Theriogenology*. 1991;36(6):1083–93.
92. Xiao X, Zi XD, Niu HR, Xiong XR, Zhong JC, Li J, et al. Effect of addition of FSH, LH and proteasome inhibitor MG132 to in vitro maturation medium on the developmental competence of yak (*Bos grunniens*) oocytes. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014;12:30.
93. Conde PA, Herrera C, Trasorras VL, Giuliano SM, Director A, Miragaya MH, et al. In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2008 Dec [cited 2015 Mar 5];109(1–4):298–308. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843200700334X>

94. Google. Google Earth [Internet]. 2018. Available from: <https://www.google.es/intl/es/earth/index.html> Earth
95. Cárdenas O, Sapana R, Gonzales M, Mamani R. Algunas Características de los Embriones Colectados de Vicuña (*Vicugna vicugna*) en el CIP Quimsachata del INIA PUNO *. *Rev Investig Altoandinas*. 1015;17(3):449–52.
96. Huanca T, Apaza N, Gonzales M. Experiencia del INIA en el fortalecimiento del banco de germoplasma de camélidos domésticos. In: XX Reunión ALPA, XXX Reunión APPA. Cusco-Perú: Arch. Latinoam. Prod. Anim; 2007. p. 186–94.
97. Bravo PW, Flores U, Garnica J, Ordoñez C. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*. 1997;47(3):619–26.
98. Bavister BD, Yanagimachi. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. *Biol Reprod*. 1977;16(2):228–37.
99. Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. 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*. 1999;52(4):683–700.
100. Caixeta ES, Machado MF, Ripamonte P, Price C, Buratini J. Effects of FSH on the expression of receptors for oocyte-secreted factors and members of the EGF-like family during in vitro maturation in cattle. *Reprod Fertil Dev*. 2013;25(6):890–9.
101. Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SLC, Conti M. EGF-Like Growth Factors As Mediators of LH Action in the Ovulatory Follicle. *Science* (80-). 2004;303(5658):682–4.
102. Ashkenazi H, Cao X, Motola S, Popliker M, Conti M, Tsafiriri A. Epidermal growth factor family members: Endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology*. 2005;146(1):77–84.
103. Conti M, Hsieh M, Park J-Y, Su Y-Q. Role of the Epidermal Growth Factor Network in Ovarian Follicles. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2006;20(4):715–23. Available from: <https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/me.2005-0185>
104. Abu-El Naga E, El-Sheikh Ali H, Balboula A, Ramdan Badr M, Abd El-Moneim M, Said Hussein M, et al. Effect of Enrichment of In Vitro Fertilization Medium with Cysteine on Fertilization and Embryo Development in Buffaloes. *Int J Vet Heal Sci Res* [Internet]. 2017;5(6):196–9. Available from: <http://scidoc.org/articlepdfs/IJVHSR/IJVHSR-2332-2748-05-602.pdf>
105. De Matos DG, Furnus CC, Moses DF. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod*. 1997;57(6):1420–5.

106. Bing YZ, Nagai T, Rodriguez-Martinez H. Effects of Cysteamine, FSH and Estradiol-17 β on In Vitro Maturation of Porcine Oocytes. *Theriogenology*. 2001;55(01):867–76.
107. Zuelke KA, Brackett BG. Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell-enclosed and denuded oocytes after in vitro maturation with luteinizing hormone. *Biol Reprod* [Internet]. 1993;48(4):815–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8485246
108. Yong H, Oh H, Lee S, Cheong H, Yang B, Park C. Treatment of Epidermal Growth Factor (EGF) enhances Nuclear Maturation of Porcine Oocytes and Stimulates Expression of ER / Golgi Transport Proteins. *Dev Reprod*. 2017;21(2):131–8.
109. Samaké S, Amoah EA, Mobini S, Gazal O, Gelaye S. In vitro fertilization of goat oocytes during the non-breeding season. *Small Rumin Res*. 1999;35(1):49–54.
110. Byskov A, Yding Andersen C, Hossaini A, Guoliang X. Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH. *Mol Reprod Dev*. 1997;46(3):296–305.
111. Trasorras V, Baca Castex C, Alonso A, Giuliano S, Santa Cruz R, Arraztoa C, et al. First llama (Lama glama) pregnancy obtained after in vitro fertilization and in vitro culture of gametes from live animals. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2014 Jul [cited 2015 Feb 20];148(1–2):83–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432014001158>
112. Gamarra G, Huaman E, Carpio M, Alvarado E, Asparrin M, Vivanco HW. First in vitro embryo production in alpacas (Lama pacos). *Reprod Fertil Dev*. 2008;21(1):177–8.
113. Donnay I, Verhaeghe B, Neirinckx G. Enriching a defined maturation medium improves subsequent embryonic development of bovine oocytes cultured in small and large groups. *Reprod Fertil Dev*. 2004;16(2):274.
114. Khatir H, Anouassi A. The first dromedary (Camelus dromedarius) offspring obtained from in vitro matured, in vitro fertilized and in vitro cultured abattoir-derived oocytes. *Theriogenology*. 2006;65(9):1727–36.
115. Choi YH, Carnevale EM, Seidel GE, Squires EL. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology*. 2001;56(4):661–70.
116. Morton KM, Maxwell WMC, Evans G. The effect of FSH concentration during IVM and gamete co- incubation length during IVF on the development of unstimulated prepubertal ewe oocytes. *Reprod Fertil Dev*. 2004;16:205.



ANEXOS

Anexo 1. Colección de ovarios, recuperación y selección de ovocitos de alpaca.



Figura 8. a: obtención del ovario desde el aparato reproductor de la alpaca; b: recuperación de ovocitos de alpaca mediante Slicing folicular.

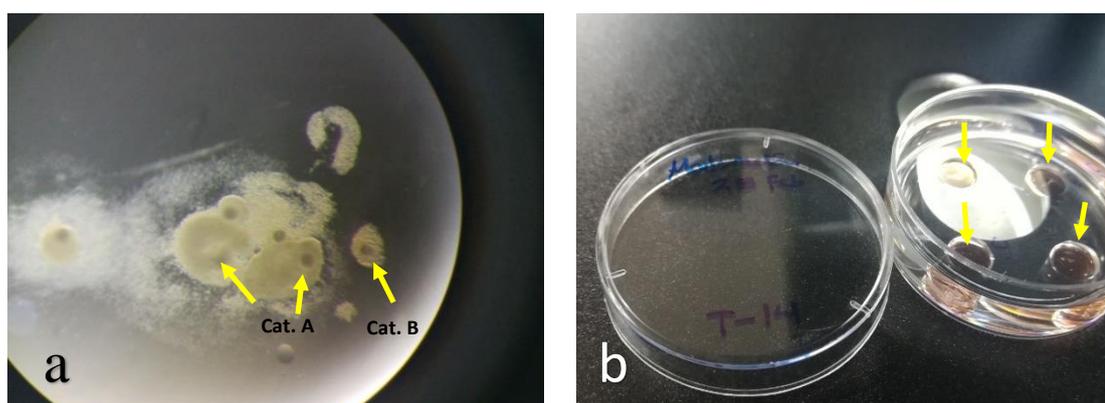


Figura 9. a: ovocitos de alpaca de categoría A y B; b: ovocitos en gotas de maduración TCM suplementado con FSH, LH, eCG según tratamientos.

Anexo 2. Evaluación nuclear de ovocitos madurados *in vitro* y tasa de clivaje de embriones de alpaca.

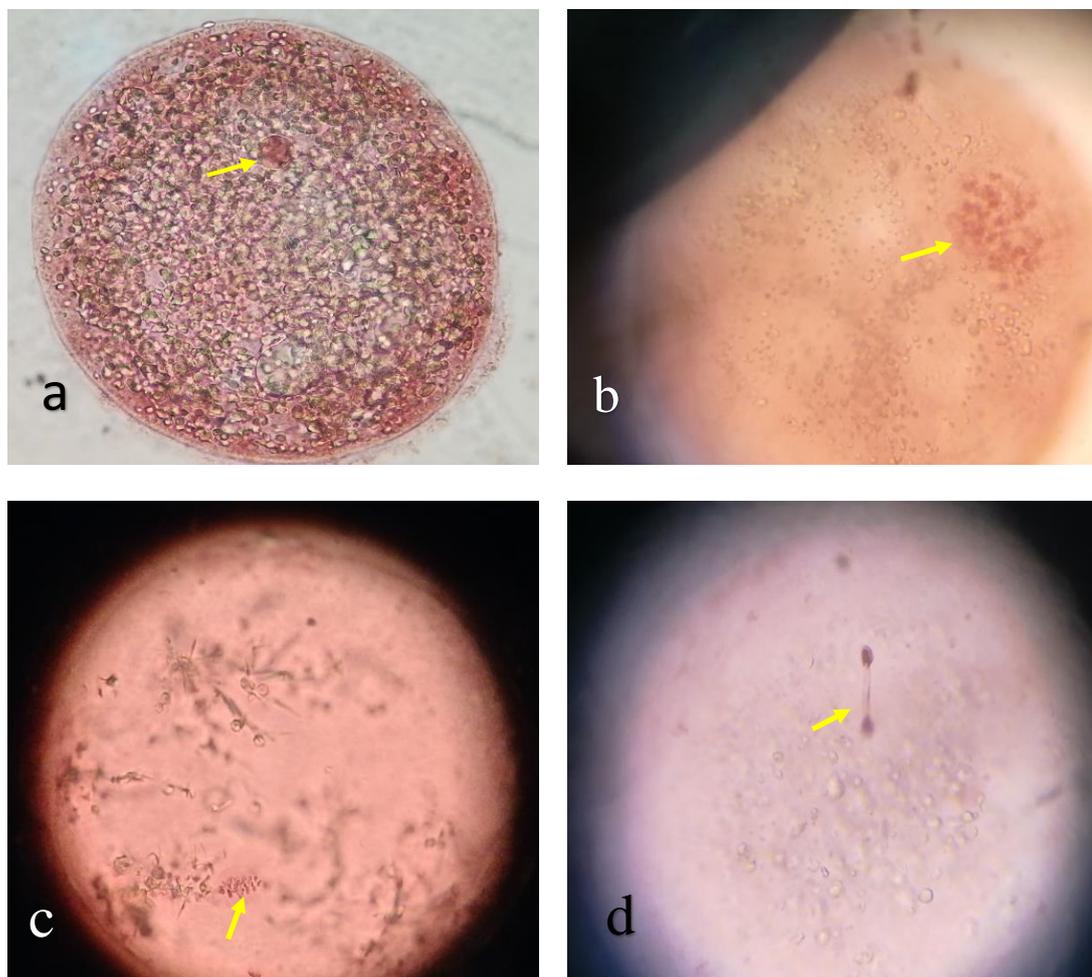


Figura 10. Observación microscópica a objetivo 100 x a: ovocito en etapa nuclear de vesícula germinal; b: ovocito en etapa nuclear de vesícula germinal rota; c: ovocito en etapa nuclear de metafase I; d: ovocito en etapa nuclear de anafase I.

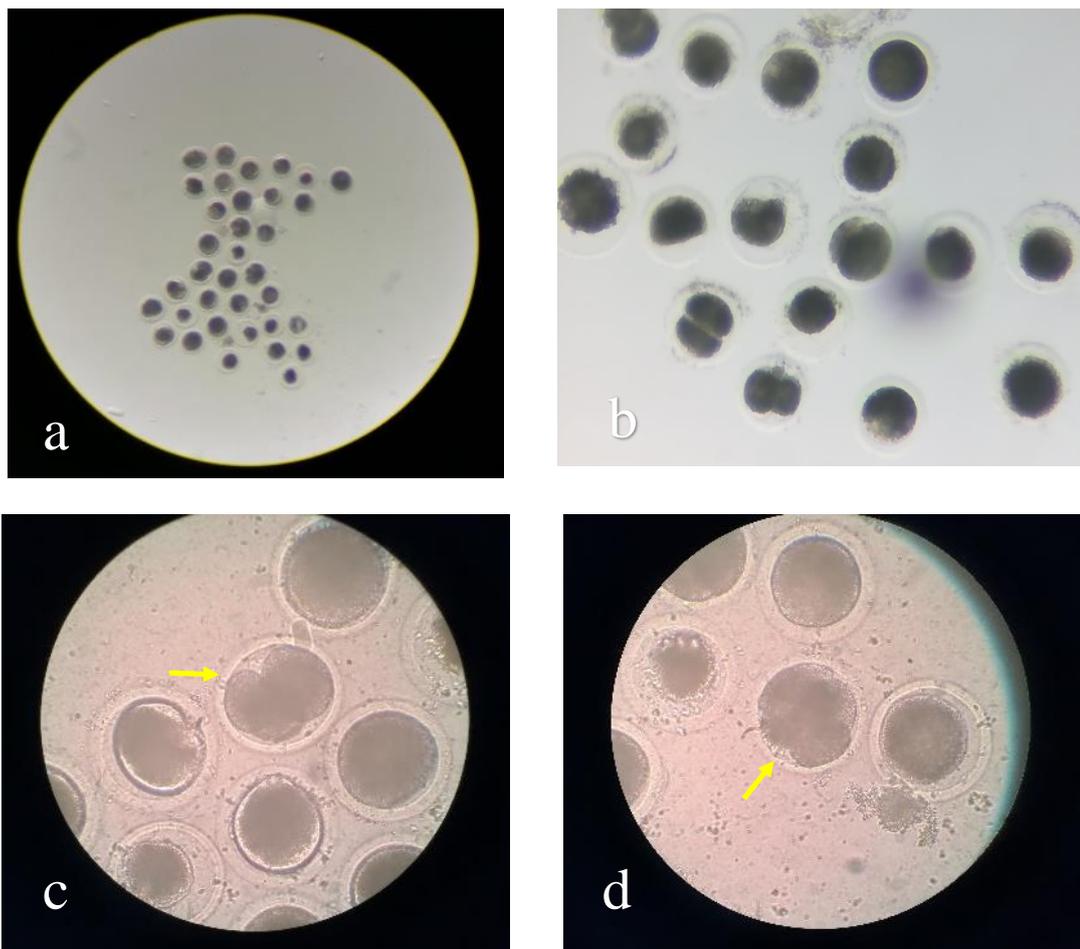


Figura 11. Embriones de alpaca cultivados *in vitro* en medio SOF evaluados a 48 h de cultivo. a, b: embriones en diferentes etapas de división, observado con estereomicroscopio a objetivo 2x y 4X; c: embrión de cuatro células, observado con microscopio a objetivo 100 x; d: embrión de alpaca de ocho células.

Anexo 3. Químicos y reactivos utilizados en la maduración de ovocitos, fertilización y cultivo de embriones *in vitro*.

Químico y/o reactivo	Acrónimo	Laboratorio
Hormona Folículo Estimulante	FSH	Bioniche Animal Health
Hormona Luteinizante	LH	Sigma
Gonadotropina Coriónica Equina	eCG	MSD Salud Animal
Penicilina		Sigma
Estreptomicina		Sigma
Anfoterecina B		Sigma
Albúmina sérica bovina	BSA	Sigma
Medio 199	TCM – 199	Sigma
Ácido 4-(2-hidroxi-etileno)-1-piperazina-etano sulfónico	HEPES	Sigma
NaHC03		Sigma
Piruvato de sodio		Sigma
Cisteína		Sigma
Glutamina		Sigma
Factor de crecimiento epidermal	EGF	Sigma
17 β estradiol	E2	Sigma
OptiXcell		inv Technologies
Percoll		Sigma
Penicilamina		Sigma
Hipotaurina		Sigma
Epinefrina		Sigma
Heparina		Sigma
NaCl		Sigma
CaCl ₂ .2HO		Sigma
KCl		Sigma
MgCl ₂ .6H ₂ O		Sigma
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O		Sigma
Lactato de Na		Sigma
Piruvato de Na		Sigma
NaHCO ₃		Sigma
Gentamicina		Sigma
Lactato de Na		Sigma
NaHCO ₃		Sigma
BSA libre ácido grasos		Sigma
Gentamicina		Sigma
MgSO ₄		Sigma

Rojo fenol		Sigma
BEN aminoácidos esenciales		Sigma
MEN aminoácidos no esenciales		Sigma
Ácido cítrico		Sigma
Myo-inositol		Sigma
Suero fetal bovino	SFB	Sigma

Anexo 4. Análisis de varianza de maduración de ovocitos y cultivo de embriones *in vitro* de alpacas.

Tabla 7.

Análisis de varianza de etapa nuclear vesícula germinal (VG) de ovocitos madurados in vitro de alpaca.

Fuentes de variabilidad	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
Tratamiento	8	8.844	1.105	1.590	0.164
Error	36	25.088	0.697		
Total	44	33.931			

Tabla 8.

Análisis de varianza de etapa nuclear vesícula germinal rota (VGBD) de ovocitos madurados in vitro de alpaca.

Fuentes de variabilidad	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
Tratamiento	8	1.076	0.134	43.840	<.0001
Error	36	0.110	0.003		
Total	44	1.186			

Tabla 9.

Análisis de varianza de etapa nuclear metafase I (MI) de ovocitos madurados in vitro de alpaca.

Fuentes de variabilidad	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
Tratamiento	8	0.145	0.018	9.640	<.0001
Error	36	0.068	0.002		
Total	44	0.212			

Tabla 10.

Análisis de varianza de etapa nuclear metafase II (MII) de ovocitos madurados in vitro de alpaca.

Fuentes de variabilidad	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
Tratamiento	8	2.524	0.316	191.110	<.0001
Error	36	0.059	0.002		
Total	44	2.584			

Tabla 11.

Análisis de varianza de etapa nuclear degenerados (DG) de ovocitos madurados in vitro de alpaca.

Fuentes de variabilidad	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
Tratamiento	8	2.524	0.316	191.110	<.0001
Error	36	0.059	0.002		
Total	44	2.584			

Tabla 12.

Análisis de varianza de clivaje embrionario de alpaca en cultivo in vitro

Fuentes de variabilidad	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > F
Tratamiento	8	1.125	0.141	43.400	<.0001
Error	36	0.117	0.003		
Total	44	1.242			

Anexo 5. Prueba de comparación de medias Bonferroni para maduración de ovocitos y cultivo de embriones *in vitro* de alpacas.

Tabla 13

Tests T Bonferroni (Dunn) para etapa nuclear vesícula germinal rota (VGBD) de ovocitos madurados in vitro de alpaca.

Alpha				0.05
Grados de error de libertad				36
Error de cuadrado medio				0.003
Valor crítico de t				3.465
Diferencia significativa mínima				0.121

Bon Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	0.67	5	T3
A	0.65	5	T2
A	0.65	5	T1
B	0.50	5	T4
B	0.50	5	T5
B	0.46	5	T6
C	0.29	5	T8
C	0.28	5	T9
C	0.27	5	T7

Tabla 14

Tests T Bonferroni (Dunn) para etapa nuclear metafase I (MI) de ovocitos madurados in vitro de alpaca.

Alpha				0.05
Grados de error de libertad				36
Error de cuadrado medio				0.002
Valor crítico de t				3.465
Diferencia significativa mínima				0.095

	Bon Agrupamiento	Media	N	TRAT
	A	0.46	5	T7
	A	0.44	5	T9
	A	0.43	5	T8
B	A	0.38	5	T6
B	A	0.37	5	T4
B	A	0.36	5	T5
B		0.31	5	T3
B		0.31	5	T2
B		0.30	5	T1

Tabla 15

Tests T Bonferroni (Dunn) para etapa nuclear metafase II (MII) de ovocitos madurados in vitro de alpaca.

Alpha				0.05
Grados de error de libertad				36
Error de cuadrado medio				0.002
Valor crítico de t				3.465
Diferencia significativa mínima				0.089

	Bon Agrupamiento	Media	N	TRAT
	A	0.88	5	T8
	A	0.87	5	T9
B	A	0.83	5	T7
B	C	0.75	5	T6
	C	0.72	5	T5
	C	0.69	5	T4
	D	0.34	5	T1
	D	0.29	5	T3
	D	0.29	5	T2

Tabla 16

Tests T Bonferroni (Dunn) para etapa nuclear degenerado (DG) de ovocitos madurados in vitro de alpaca.

Alpha				0.05
Grados de error de libertad				36
Error de cuadrado medio				0.003
Valor crítico de t				3.465
Diferencia significativa mínima				0.123

Bon Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	0.664	5	T1
A	0.664	5	T3
A	0.636	5	T2
B	0.396	5	T4
B	0.374	5	T7
B	0.354	5	T6
B	0.348	5	T5
B	0.316	5	T8
B	0.282	5	T9

Tabla 17

Tests T Bonferroni (Dunn) para clivaje embrionario de alpaca en cultivo in vitro.

Alpha				0.05
Grados de error de libertad				36
Error de cuadrado medio				0.003
Valor crítico de t				3.465
Diferencia significativa mínima				0.125

Bon Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	0.598	5	T9
A	0.586	5	T8
B	0.556	5	T7
B	0.496	5	T6
B	0.474	5	T5
B	0.452	5	T4
C	0.218	5	T2
C	0.202	5	T3
C	0.198	5	T1