

CULTIVO IN VIVO DE EMBRIONES DE ALPACAS EN EL OVIDUCTO VERSUS CULTIVO DE EMBRIONES IN VITRO

In vivo culture of alpaca embryos in the oviduct versus embryo culture in vitro

M.G. Pérez Durand¹; J.P. Zevallos Aragon¹, U.H. Perez Guerra²

1 Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano, Puno-Perú.

2 Laboratorio de Reproducción animal, Instituto de Investigaciones Tropicales y de Altura-El Mantaro, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.

* Corresponding author
M.G. Pérez Durand

E-mail: guidpe@yahoo.es

ABSTRACT

The present study was carried out in the Animal Reproduction Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootecnics of the National University of Altiplano, with the objective of evaluating the effect of in vitro and in vivo culture of alpaca zygotes produced in vitro. 226 cumulus oocyte complexes (COCs) were used, which were obtained from the ovaries from animals benefited in the slaughterhouse and transported for 6 h at 32 - 35°C in 0.9% saline with antibiotics. The COCs were aspirated from 2 to 4 mm follicles being matured in TCM 2520 supplemented with 2.2 mg/mL of sodium bicarbonate, 0.0028 mg/mL of sodium pyruvate, 10% of fetal serum, 2 IU/mL of equine chorionic gonadotropin (eCG), 10 IU/mL human chorionic gonadotropin (hCG) plus 50 µg/mL gentamicin and were cultured at 38.5°C (with 5% CO₂ and high humidity for 36 h). Mature oocytes were fertilized in drops of FERT TALP (10 oocytes/ drop) inside petri dishes which were incubated for 24 h at 38.5°C (humid atmosphere with 5% CO₂), for the in vitro culture of 30 zygotes the synthetic oviductal fluid medium (SOF) was used for 168 h and for in vivo culture, the oviduct of females was used, to which 32 zygotes were transferred up to 168 h. The results were: at 120 h of in vitro culture post fertilization, 19 (17.4%) morulae and 8 (7.3%) blastocysts were observed and at 168 h, 18 (16.5%) morulae and 7 (6.4%) blastocysts were observed. From the in vivo culture in the oviduct of the recipient alpacas, 3 hatched blastocysts, 5 collapsed blastocysts and 2 collapsed blasts were recovered in degeneration. The in vitro and in vivo culture of zygotes produced in vitro can be used for the production of alpaca embryos.

Keywords: oocyte , zygote, culture , embryos, alpaca.

RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo en Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano siendo el objetivo evaluar el efecto del cultivo in vitro e in vivo de los cigotos de alpacas producidos in vitro. Se utilizaron 226 Complejos cúmulus ovocitos (CCOs), que fueron obtenidos de los ovarios procedentes de animales beneficiados en el camal y transportados por 6 h a 32 - 35°C en solución salina 0.9% con antibióticos. Los CCOs fueron aspirados de folículos de 2 a 4 mm siendo madurados en TCM 2520 suplementado con 2.2 mg/mL de bicarbonato de sodio, 0.0028 mg/mL de piruvato de sodio, 10% de suero fetal, 2 UI/mL de gonadotropina coriónica equina (eCG), 10 UI/mL de gonadotropina coriónica humana (hCG) más 50 µg/mL de gentamicina y fueron cultivados a 38.5°C (con 5% de CO₂ y alta humedad por 36 h). Los ovocitos maduros fueron fertilizados en gotas de FERT TALP (10 ovocitos/gota) dentro de placas de petri las cuales se incubaron por 24 h a 38.5°C (atmósfera húmeda con 5% de CO₂); para el cultivo in vitro de 30 cigotos se utilizó el medio de fluido oviductal sintético (SOF) por 168 h y para el cultivo in vivo se utilizó el oviducto de hembras a las que se les transfirió 32 cigotos hasta 168 h. Los resultados fueron: a las 120 h de cultivo in vitro post fecundación se observaron 19(17.4%) mórulas y 8 (7.3%) blastocitos y a las 168 h se observaron 18 (16.5%) mórulas y 7(6.4%) blastocitos. Del

cultivo in vivo en el oviducto de las alpacas receptoras se recuperaron 3 blastocitos eclosionados, 5 blastocitos colapsados y 2 blastocitos colapsados en degeneración. El cultivo in vitro e in vivo de los cigotos producidos in vitro es posible utilizar para la producción de embriones de alpacas.

Palabras clave: Ovocito, cigoto, cultivo, embriones, alpaca

INTRODUCCION

En camélidos sudamericanos, los estudios realizados en fecundación in vitro son de número reducido. En llamas, para el cultivo de embriones utilizaron medio de cultivo de tejidos (TCM), suero de ternero castrado y células oviductales (Del Campo et al., 1994; Sansinena et al., 2007), TCM conteniendo células oviductales de vacunos (Ratto et al., 2007), SOFm con aminoácidos esenciales, aminoácidos no esenciales, L-glutamine y BSA (Conde et al., 2008). En alpacas cultivaron los cigotos en el medio SOF (Arriaga et al., 2014; Ruiz et al., 2013), donde todos los autores indican haber logrado alrededor del 6% el desarrollo de blastocitos posterior a 7 días de cultivo.

La meta final de la maduración y fecundación in vitro de los ovocitos obtenidos por aspiración de los ovarios de hembras (camellos) es para producir embriones de alta calidad y lograr éxito al transferir a recipientes (Khatir and Anouassi, 2006). En camellos se han realizado varios estudios sobre la maduración, fecundación y cultivo in vitro, estos estudios utilizaron para el cultivo de los embriones, TCM, células de la granulosa y oviductales (Khatir et al., 2004) mKOMaa+10% de suero (Khatir and Anouassi, 2006) TCM, L-glutamine, 1% ITS+10% EDS (Wani, 2009), obteniendo la división de embriones, blastocitos y blastocitos eclosionados en proporciones disminuidas frente a los embriones logrados en otras especies. Asimismo, varios investigadores cultivaron temporalmente cigotos obtenidos por fecundación in vitro en el oviducto de animales, tales como la coneja (Boland, 1984), oveja (Lazzari et al., 2010; Rizos et al., 2002), vaca (Tsfaye et al., 2007) logrando el desarrollo de los embriones de calidad, medidos en base a morfología, expresión génica, criotolerancia y tasas de preñez.

El objetivo del presente estudio es evaluar la capacidad de desarrollo de cigotos de alpaca transferidos temporalmente al oviducto de alpaca receptora posterior a la maduración y fecundación in vitro

MATERIALES Y METODOS

Los reactivos usados fueron comprados de Sigma Chemicals (Sigma-Aldrich®) a menos que se indique lo contrario.

Colección y maduración de los ovocitos

Los ovarios de alpaca fueron colectados del camal de Nuñoa, transportados por 6 h al laboratorio, dentro un termo conteniendo solución fisiológica (0.9% de NaCl) temperado a 32 a 35°C. En el laboratorio los ovarios fueron lavados dos veces con solución fisiológica que contenía 100 UI/mL de penicilina G y 100 µg/ml de estreptomycin. Los complejos cúmulos ovocitos (CCOs) fueron aspirados de los folículos de 2 a 4 mm, usando una aguja de 20G de 1pulg, adosado a jeringa de 5 ml. Después de la colección los CCOs fueron lavados 3 veces, en solución buffer fosfato (PBS) suplementado con 4 mg/ml de albumina sérica bovina (BSA) más 50 µg/ml de gentamicina. Los CCOs con citoplasma oscuro, uniforme y con varias capas de las células de cúmulos fueron utilizados para la maduración. Cada 10 CCOs fueron lavados dos veces

en el medio de maduración y luego transferidos a 60 µl de medio de maduración. El medio de maduración fue elaborado a base de TCM 2520, suplementado con 2.2 mg/mL con bicarbonato de sodio, 0.0028 mg/mL de piruvato de sodio, 10% de suero fetal, 2 UI/mL de gonadotropina coriónica equina (eCG; Folligon, Intervet Pty. Ltd., Netherlands), 10 UI/mL de gonadotropina coriónica humana (hCG; N.V. Organon O.S. Holland) más 50 µg/mL de gentamicina y fueron cultivados dentro una incubadora a 38.5°C, bajo 5% de CO₂ y con una humedad (> 90%) por 36 h.

Colección y preparación de los espermatozoides

Previamente se preparó dos machos con desviación de los conductos deferentes (Pérez et al., 2006). Para la colección de los espermatozoides se colocaron a los machos sobre una mesa en posición decúbito lateral, siendo sujetados los miembros posteriores por dos auxiliares. La colección fue realizado de acuerdo a lo descrito por Pérez et al. (2006), con la variación que el medio de colección fue 1 mL de solución de tiroides modificado (SPERM TALP: 100 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 25.0 mM NaHCO₃, 0.3 mM NaH₂PO₄, 21.6 mM lactato de sodio, 2.0 mM CaCl₂, 0.4 mM MgCl₂, 10.0 mM HEPES, 1.0 mM de piruvato de sodio, 3 mg/ml BSA fracción V y 50 µg/mL de sulfato de gentamicina; Parrish et al., 1988), la suspensión de los espermatozoides para el swimp up fue llevado a una incubadora por 1 h a 38.5°C, con 5% de CO₂ y alta humedad. Del sobrenadante se aspiró 700 µL y se centrifugaron a 350 x g por 10 min, desechando el sobrenadante. El pellet formado por los espermatozoides fue re-suspendido con 100 µL de solución de tiroides modificado (FERT TALP: 114.0 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 25.0 mM NaHCO₃, 0.3 mM NaH₂PO₄, 10.0 mM lactato de sodio, 2.0 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 0.25mM de piruvato de sodio, 6 mg/ml de BSA libre de ácidos grasos y 50 µg/mL de sulfato de gentamicina (Parrish et al., 1988) y la concentración de los espermatozoides fue ajustado a 5 x 10⁶ por mL (Conde et al., 2008); tomando en cuenta la motilidad total de los espermatozoides.

Fecundación in vitro

Las células del cúmulo fueron removidas por vortex en 45 seg en 0.5 mL de PBS + 0.4 mg/mL de BSA, dentro un tubo de ensayo de 7 mL de capacidad. Los ovocitos desnudos se evaluaron la maduración ovocitaria por presencia del corpúsculo polar bajo un microscopio estereoscópico invertido a 100X y 200X. Los ovocitos desnudos fueron lavados 2 veces en medio FERT TALP (Parrish et al., 1988) y luego fueron transferidos a una gota de 44 µl de FERT TALP (10 ovocitos), dentro de placas de petri de 35 mm x 10 mm, cubiertos con aceite mineral, seguidamente (10 min antes de la fecundación) se suplementaron a la gota de fecundación con 2 µL de la mezcla (500 µM de penicillamine, 250 µM de hipotaurina, 500 µM de epinefrina (Leibfried and Bavister, 1982) más 10 µg/mL de heparina (Conde et al., 2008) y 2 µL de la concentración de espermatozoides. Finalmente se incubaron por 24 h a 38.5°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Cultivo de los cigotos

Los presuntos cigotos fueron vorterizados por 45 s para retirar el resto de los espermatozoides. Los cigotos se colocaron al medio de cultivo (10 a 15 cigotos en 50 µL cubiertos con aceite mineral) fluido oviductal sintético (SOF) (Tervit et al., 1972) suplementado con el 2% (v/v) de aminoácidos esenciales, 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, 50 µg/mL de gentamicina más 5% de suero fetal en los 4 primeros días de cultivo y el 1% de suero fetal los días siguientes. La incubación se realizó a 38.5°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Evaluación del desarrollo embrionario in vitro

La división celular y el desarrollo embrionario se registraron las imágenes a los 48, 120 y 168 h post fecundación, con ayuda de un microscopio estereoscópico invertido a 100X, 200X y 400X.

Cultivo de cigotos en el oviducto de alpaca

A las alpacas receptoras (n=3), se monitoreo la presencia del folículo pre-ovulatorio > 7 mm, usando un ultrasonografo con un transductor lineal de 7.0 MHz (ChisonD600 VET). Se indujo la ovulación con la aplicación (IM) de 8 µg de GnRH, a las 24 h se evaluó la ovulación por ultrasonografía. Los presuntos cigotos producto de la maduración y fecundación in vitro se colocaron en el oviducto de las alpacas 60 h post aplicación de GnRH. Para exteriorizar el oviducto de las alpacas se realizó una laparotomía medial, para lo cual se anestesió a la hembra administrando vía intravenosa 0.4 mg de Xilacina (Clorhidrato de Xilacina, 5 mg/kg de ketamina (Ketamina, Laboratorios Veinfar I.C.S.A. Argentina). Para mantener la anestesia se colocó una cánula en la vena yugular para suplementar 5 mg de ketamina cada 15 min hasta los 30 min (Ratto et al., 2007). Por una incisión de 10 cm realizado en la línea alba a 4 cm de la glándula mamaria, con ayuda de los dedos se exteriorizó el ovario con la presencia de formación del cuerpo lúteo. Se fijo entre los dedos el infundíbulo y a 2 cm del ovario en dirección al ampulla y se apertura el oviducto con ayuda de una aguja 18 G y 1.5 pulg. Con ayuda del capilar de vidrio de un micro dispensador (Drummond Scientific Company), y calibrado para 5 µL los cigotos se cargaron en PBS + 10% de suero fetal, se introdujeron a partir de la apertura a una profundidad mayor a 3.5 cm dentro el oviducto.

Recuperación de los embriones del oviducto de las receptoras.

Las receptoras fueron colocadas en ayuno de 24 h y el día de la recuperación de los embriones se procedió de la siguiente manera:

a) 20 min antes de la recuperación se tranquilizaron a las receptoras aplicando 1 mg de maleato de acepromazina/Kg

de peso vivo, b) La receptora fue inmovilizada sobre una mesa, pasando las cuerda por encima de la región de la cruz y grupa, c) Se introdujo la mano izquierda enguantada y lubricada por el recto para vaciar el contenido fecal, d) se higienizo con abundante agua y jabón la región perianal y secando la región con papel toalla y se desinfecto con alcohol, e) Se aplicó una anestesia epidural aplicando 1.5 de mL de lidocaína clorhidrato al 2% (Laboratorios unidos S.A. Lima-Perú), f) Con la ayuda de la guía del aplicador para inseminación artificial de vacunos, se introdujo la sonda Foley N°16 Fr/Ch de dos vías para atravesar la cérvix y dirigirla hacia el cuerno ipsilateral, g) Ubicado el cuerno se fijó la sonda insuflando el balón con 7 a 10 mL de aire, luego se retiró la guía, h) Se conecto un sistema de tubos de goma en forma de "Y", que estaba conectado al frasco que contenía el medio de lavado PBS+1% de suero fetal. Por gravedad se llenó el medio al cuerno uterino, hasta sentir la turgencia, momento en que se cerró el clip para luego dejar salir el medio de lavado hacia el filtro colector con ayuda de masajes suaves, i) Este procedimiento se repitió por tres o cuatro veces, luego se extrajo el aire del balón para retirar la sonda Foley, j) El filtro colector se llevó al laboratorio para que el contenido sea vertido en una placa de petri y seguidamente se realizó búsqueda y clasificación de los embriones, con ayuda de un microscopio estereoscópico.

Análisis estadístico

Los resultados al ser porcentuales en las variables se evaluaron mediante la prueba estadística no paramétrica de Chi-cuadrado, evaluando la dependencia entre el tipo cultivo de embriones que se procedió, todos analizados en el programa estadístico R 3.5.1.

RESULTADOS

En el momento de la fecundación se observaron 2 embriones con dos células indicando que se debe a la partenogénesis. Durante cultivo de los embriones in vitro se perdieron 5 embriones. Los resultados de producción de embriones directamente se evaluaron a partir de la división, 48 h post fecundación, se muestran en la Tabla 1 y Figura 1. El número de embriones asignados para el cultivo in vitro e in vivo fueron 30 y 32 cigotos respectivamente, producto de la maduración y fecundación de los grupos de ovocitos asignados para cada tratamiento y sometidos a la prueba de Chi cuadrado no mostraron dependencia (p> 0.05). Durante la evaluación a las 48 h post fecundación también se observaron ovocitos con la presencia del primer corpúsculo polar en un total de 11 ovocitos en metafase II que no fecundaron.

Tabla 1. Proporción de embriones con diferentes estados desarrollados en cultivo in vitro e in vivo

	Total de ovocitos	48 horas		120 horas		168 horas	
		División	Mórula	Blastocisto	Mórula	Blastocisto	
Cultivo in vitro	109	30 (27.5%)	19 (17.4%)	8 (16.5%)	18 (16.5%)	7 (6.4%)	
Cultivo in vivo	117	32 (27.3%)	3 Be (9.3%), 5Bc (15.6%), 2Bd (6.2%)		

Be= Blastocito eclosionado, Bc= Blastocito colapsado, Bd= Blastocito colapsado degenerado.

En la evaluación a las 120 h post fecundación, los embriones se observaron en diferentes estadios mórulas 19 (17.4%) y blastocitos 8 (16.5%). Entre las cuales 16 fueron mórulas compactas y 3 mórulas con 4 a 8 células en las cuales se observaron blastómeros con desarrollo desigual. Los 7 blastocitos estuvieron en el estado de inicial y 1 blastocito expandido. A las 168 h post fecundación en el cultivo de los embriones se observaron 18 mórulas (16.5%) y 7 (6.4%) blastocitos. Donde 2 mórulas se mantenían como compactas, 3 mórulas estuvieron detenidas con 4 a 8 células y en proceso de degeneración, 11 mórulas en proceso de degeneración y deformación. En el total de blastocitos 7 se observaron en proceso de degeneración y deformación.

Los 32 cigotos con 2 células asignadas para el cultivo in vivo que se transfirieron a oviductos de 3 alpacas (10, 11, 11

cigotos). El lavado uterino de las receptoras se realizó a las 168 h (7 días) post fecundación de las alpacas receptoras. De los 32 cigotos de 2 células transferidos a los oviductos se recuperaron 10 embriones, que hacen el 31.2% de tasa de recuperación y en diferentes estadios 3 blastocitos eclosionados, 5 blastocitos colapsados y 2 blastocitos colapsados en degeneración. Que comparadas con la producción in vitro de embriones es una cantidad inferior y sometidos a la prueba de Ji-cuadrado son dependientes ($p \leq 0.05$).

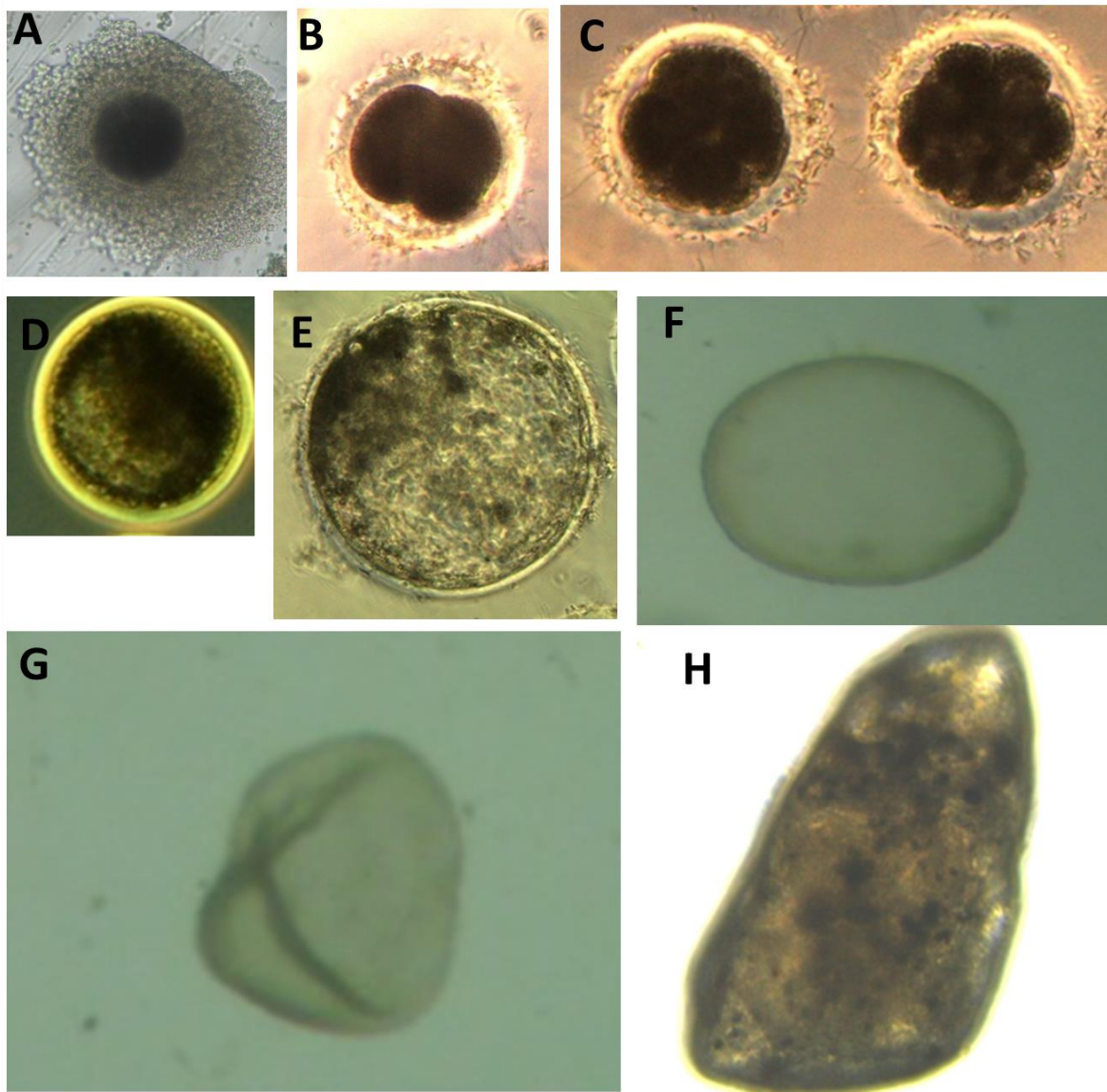


Figura 1. A) Ovocito categoría A, B) Cigoto en división, C) Mórula compacta D) Blastocisto inicial, E) Blastocisto expandido, F) Blastocisto eclosionado, G) Blastocisto colapsado, H) Blastocisto colapsado degenerado.

DISCUSION

La división de los embriones en el presente trabajo fue observada con la ayuda de un microscopio estereoscópico invertido con aumentos de 100X, 200X y 400X. A la fecha existen pocos estudios en producción de embriones in vitro en camélidos, nuestros resultados de 27.4% de división de embriones, fue similar a lo reportado en llamas con 15.85% embriones con 2 a 16 células (Del Campo et al., 1994), en alpacas con 19.8% de porcentaje de división (Huanca et al., 2014), en alpacas con 27.3% de embriones divididos (Arriaga et al., 2014).

La fecundación in vitro en camélidos aun esta en fase de investigación y se espera elevar los índices de eficiencia, tal como en vacunos que llegan alrededor del 70% de división de los embriones después de 44 a 48 h post fecundación (Coleman et al., 2007). La presencia de embriones partenogénicos en camélidos se manifiestan en un 3% (Del Campo et al., 1994), ratificando en las observaciones realizadas en el presente estudio. En camellos, varios investigadores reportaron porcentajes de división de los embriones con 2 a 16 células de 15.92 y 33% aplicando diferentes protocolos de producción de embriones in vitro (Abdoon et al., 2011; Khatir et al., 2004).

En el presente estudio a las 120 h (5 días) de cultivo post fecundación la proporción de embriones que se lograron fueron 19 (17.4%) mórulas compactas y 8 (7.3%) de blastocitos tempranos. En la cronología del desarrollo embrionaria, los embriones a los 5 post ovulación reportaron que el 100% de los embriones están estado de mórula y todavía permanecen en el oviducto (Picha et al., 2012). Extiende una diferencia en el estadio de embriones a las 120 h en el presente estudio, donde esta variación se atribuiría al efecto de los medios de cultivo utilizados y tipo de folículos aspirados para producción de embriones in vitro en la especie alpaca. En camélidos no existen reportes de embriones cultivados por 5 días o 120 h post fecundación, pero si reportan a partir de los 7 días post fecundación. En camellos reportan un 20% de blastocitos a los 4 días de evaluación, sin tipificar el estado de los blastocitos, utilizando para la fecundación espermatozoides de epidídimo (Wani, 2009). Esta variabilidad de embriones evaluados a las 120 h o 5 días post fecundación en camélidos y camellos se atribuiría al efecto de la especie y los medios de cultivo utilizados.

En el presente estudio a las 168 h (7 días) post fecundación se logró 18 (16.5%) mórulas, 7 (6.4%) blastocitos, donde en todos los embriones se notaron el proceso de degeneración y deformación. En previos estudios en llamas reportaron el 5.6% de mórulas y 6.0% de blastocitos tempranos posterior a 7 días post fecundación y en el cultivo con la presencia de células oviductales de llama (Del campo et al., 1994). En alpacas lograron el 21.1% de blastocitos de los diferentes tratamientos que sometieron a los ovarios a una conservación por 16 h y a diferentes temperaturas antes de la colección de los ovocitos (Arriaga et al., 2014). La proporción de embriones producidos en alpacas y contrastados con los resultados del presente estudio son similares.

La presencia de los embriones con procesos de degeneración se atribuirá al medio de cultivo utilizado que son de vacunos y no poseen los requerimientos específicos para los embriones de alpacas u otros factores que no se pueden controlar en la altura (3870 msnm). Mientras que comparado la proporción de embriones del presente estudio superan a la proporción de embriones de llama, variación que atribuiría al factor especie. Pero en cuanto a la calidad de los embriones de llamas fueron superiores debido a que los autores en el medio de cultivo

suplementaron con células oviductales (Del Campo et al., 1994), que secretan factores de desarrollo y crecimiento que hacen que el embrión llegue a blastocito eclosionado.

De los 10 embriones colectados de las receptoras, fueron 3 en blastocitos eclosionados, 5 blastocitos colapsados y 2 blastocitos colapsados en degeneración. Reportes de este tipo de cultivo de embriones no existen en camélidos siendo este estudio el primero que se presenta. Sin embargo, de acuerdo a estudios sobre la cronología de desarrollo embrionario y migración uterina en hembras de monta natural indican que recién a los 8 días post ovulación asumen el estado de blastocito eclosionado y a los 9 días comienzan a elongarse (Picha et al., 2012). Nuestros resultados coinciden con el desarrollo de los embriones, asumiendo que las 168 h (7 días; 5 días de permanencia en oviducto y 48 h post fecundación). En el presente estudio se recuperó 2 embriones en estado de blastocito colapsado en degeneración, debido probablemente la ruptura que se produjo al momento de la colección por presiones externas que fue provocado por el sistema de tubos de goma, filtros que se usaron en la técnica de recuperación.

El estado cronológico de los embriones recuperados y la viabilidad observada por su morfología indican que el efecto del medio ambiente del oviducto de las hembras receptoras sobre los embriones afecto positivamente. Debido a estudios que indican que el embrión permanece después de la fecundación 3.5 a 4 días en el oviducto, durante este tiempo el embrión desarrolla y es mantenido por el fluido oviductal, este periodo es crítico para los embriones de animales porque se incluye la activación genómica embrionaria, que sirve para la diferenciación, implantación y desarrollo fetal (Memili and First, 2000; Niemann and Wrenzycki, 2000).

CONCLUSIONES

Al finalizar el cultivo in vitro se observaron diferentes estadios embrionarios, mórulas, blastocitos, donde algunas mórulas y blastocitos entraron en proceso de degeneración y deformación, los cigotos cultivados en el oviducto de hembras receptoras fueron más uniformes como blastocitos eclosionados, blastocitos colapsados con normal desarrollo. Por tanto, es necesario seguir estudiando medios específicos para la producción de embriones in vitro para alpacas y llamas.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores del presente trabajo de investigación declaran no tener ningún potencial conflicto de interés personal o económico con otras personas u organizaciones que puedan influir indebidamente con el presente artículo.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORES

Concepción y diseño del estudio (PGU, PDM), desarrollo de la metodología (PDM, ZAJ), escribe, y revisa el artículo (PDM, PGU) y supervisión del estudio (PDM, ZAJ).

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento al Proyecto de investigación Nro. 04-029-2015-OGAJ-UNA-PUNO, financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional del Altiplano.

REFERENCIAS

- Abdoon ASS, Kandil OM, Zeng SM, Cui M, Mitochondrial distribution, ATP-GSH contents, calcium [Ca²⁺] oscillation during in vitro maturation of dromedary camel oocytes. *Theriogenology*. 2011; 76: 1207–1214.
- Arriaga C, Huanca IL, Terreros WC, Becerra MG, García JJH, Ampuero PB. 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 Peru*. 2014; 25: 477–486.
- Boland MP. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology*. 1984; 21: 126–137.
- Coleman NV, Shagiakhmetova GA, Lebedeva IY, Kuzmina TI, Golubev AK. In vitro maturation and early developmental capacity of bovine oocytes cultured in pure follicular fluid and supplementation with follicular wall. *Theriogenology*. 2007; 67: 1053–1059.
- Conde PA, Herrera C, Trasorras VL, Giuliano SM, Director A, Miragaya MH, Chaves MG, Sarchi MI, Stivale D, Quintans C, Agüero A, Rutter B, Pasqualini S. In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Anim. Reprod. Sci*. 2008; 109: 298–308.
- Del Campo MR, Del Campo CH, Donoso MX, Berland M, Mapletoft RJ. In vitro fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology*. 1994; 41: 1219–1229.
- Huanca LW, Condori PR, Chileno MM, García HP, Cainzo CJ, Becerra GJJ. Evaluación 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: 468–476.
- 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, 1727–1736.
- Khatir H, Anouassi A, Tibary A. Production of dromedary (*Camelus dromedarius*) embryos by IVM and IVF and co-culture with oviductal or granulosa cells. *Theriogenology*. 2004; 62:1175–1185.
- Lazzari G, Colleoni S, Lagutina I, Crotti G, Turini P, Tessaro I, Brunetti D, Duchi R, Galli C. Short-term and long-term effects of embryo culture in the surrogate sheep oviduct versus in vitro culture for different domestic species. *Theriogenology*. 2010; 73: 748–757.
- Leibfried M, Bavister B. Effects of epinephrine and hypotaurine on in-vitro fertilization in the golden hamster. *J. Reprod. Fertil*. 1982; 66: 87–93.
- Memili E, First NL. Zygotic and embryonic gene expression in cow: A review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote*. 2000; 8, 87–96.
- Niemann H, Wrenzycki C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: Implications for subsequent development. *Theriogenology*. 2000; 53; 21–34.
- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod*. 1988; 38, 1171–1180.
- Pérez MG, Apaza E, Deza H. Congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de camélidos. *ALLPACA*. 2006; 11, 17–23.
- Picha Y, Tibary A, Memon M, Kasimanickam R, Sumar J. *Theriogenology Chronology of early embryonic development and embryo uterine migration in alpacas. Theriogenology*; 2012: 1–7.
- Ratto M, Gomez C, Berland M, Adams GP. Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Anim. Reprod. Sci*. 2007;97: 246–256.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev*. 2002; 61: 234–248.
- Ruiz J, Landeo L, Mendoza J, Artica M, Correa JE, Silva M, Miragaya M, Ratto MH. 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*. 2013; 143: 72–78.
- 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: 342–353.
- Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil*. 1972; 30: 493–497.
- Tesfaye D, Lonergan P, Hoelker M, Rings F, Nganvongpanit K, Havlicek V, Besenfelder U, Jennen D, Tholen E, Schellander K. Suppression of connexin 43 and E-Cadherin transcripts in vitro derived bovine embryos following culture in vitro or in vivo in the homologous bovine oviduct. *Mol. Reprod. Dev*. 2007; 79: 978–988.
- Wani NA. In vitro embryo production in camel (*Camelus dromedarius*) from in vitro matured oocytes fertilized with epididymal spermatozoa stored at 4 °C. *Anim. Reprod. Sci*. 2009;111: 69–79.