

EFFECT OF THE USE OF TWO SPERM SELECTION TECHNIQUES FOR IN VITRO PRODUCTION OF ALPACA EMBRYOS

Efecto del uso de dos técnicas de selección espermática en la producción in vitro de embriones de alpaca

Mijaíl Contreras Huamani^{1*}, Mary Luz Naveros², Cesar A. Olaguivel³

¹ Laboratorio de Biotecnología Reproductiva. Estación Experimental Agraria Canaán. Instituto Nacional de Innovación Agraria, Ayacucho, Perú

² Estación Experimental Agraria Santa Ana. Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). Carretera Saños Grande - Hualahoyo Km 8 Santa Ana El Tambo, Huancayo, Junín.

³ Laboratorio de Fisiología Veterinaria, Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, Perú.

* Corresponding author:
Mijaíl Contreras
E-mail:
chmijail17@gmail.com

Recibido: 07/06/2021

Aceptado: 26/07/2021

Publicado: 13/08/2021

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effect of the use of two sperm selection techniques for in vitro production of alpaca embryos. The ovaries and testis were collected from the local slaughterhouse and transport to 37 ° C in saline solution (0.9%) supplemented with gentamicin. Quality I, II and III oocytes were incubated in a maturation medium for 32 h at 38.5 ° C and 5% O₂ and 5% CO₂. For in vitro fertilization, sperm from the epididymis were selected using the Percoll gradient and Swim up technique. 18h after the oocytes were incubated with the sperm, these were denuded from the cumulus cells and cultured in SOFaa culture medium for 7 days. Morula and blastocyst rate and their morphological quality are evaluated at day 7 of culture. From a total of 370 ovaries, 1,137 oocytes were recovered, making an average of 3.6 oocytes / ovary. After the maturation and fertilization process and in vitro culture, the blastocyst rate was 8.43 ± 6.04% and 3.89 ± 1.75%, for oocytes fertilized with sperm selected with Percoll gradient and Swim up, respectively, not finding significant statistical differences (p> 0.05), between the groups. In conclusion, the in vitro fertilization of alpaca oocytes with spermatozoa selected with two selection techniques (percoll and swim up) did not significantly influence the quantity and quality of morulae and blastocysts at day 7 of embryo culture.

Keywords: Alpaca, embryo, sperm selection, Percoll, Swim up.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar el efecto del uso de dos técnicas de selección espermática en la producción in vitro de embriones de alpaca. Los ovarios y testículo fueron colectados del matadero local, y trasladados a 37°C en solución salina (0.9%) suplementado con gentamicina. Los ovocitos de calidad I, II y III fueron incubados en medio de maduración por 32 h a 38.5 ° C y 5% O₂ y 5% CO₂. Para la fecundación in vitro, los espermatozoides del epidídimo fueron seleccionados mediante la técnica de gradiente de Percoll y Swim up. 18h después de incubados los ovocitos con los espermatozoides, estos fueron denudados de las células del cumulus y cultivados en medio de cultivo SOFaa durante 7 días. Se evalúa la tasa de mórulas y blastocistos y su calidad morfológica al día 7 de cultivo. De un total de 370 ovarios se recuperaron 1137 ovocitos, haciendo un promedio de 3,6 ovocitos/ovario. Luego del proceso de maduración y fecundación y cultivo de in vitro, la tasa de blastocistos fue de 8,43 ± 6,04% y 3,89 ± 1,75%, para ovocitos fecundados con espermatozoides seleccionados con gradiente de Percoll y Swim up, respectivamente, no encontrándose diferencias estadísticas significativas (p>0.05), entre los grupos. En conclusión, la fecundación in vitro de ovocitos de alpaca con espermatozoides seleccionadas con dos técnicas de selección (percoll y swim up) no influyen significativamente en la cantidad y calidad de mórulas y blastocistos al día 7 de cultivo embrionario.

Palabras claves: Alpaca, embrión, selección espermática, Percoll, Swim up.

INTRODUCCION

La producción in vitro de embriones (PIVE), representa una alternativa productiva para el mejoramiento genético de los Camélidos Sudamericanos domésticos y silvestres (CSA), esta biotecnología puede contribuir a la multiplicación de animales de alto valor genético. Debido a ello, se vienen desarrollando diversas estrategias para incrementar la eficiencia de la producción in vitro de embriones. Sin embargo, estas aún los procedimientos para camélidos sudamericanos no están estandarizados (Mamani, 2015).

La PIVE realizada a partir de ovarios y testículos de matadero involucra cuatro procesos fundamentales, maduración in vitro de ovocitos (MIV), selección y capacitación espermática, fecundación in vitro (FIV) y cultivo in vitro de embriones (CIV); estas cuatro etapas comprenden diversos procesos fisiológicos y reacciones bioquímicas, condicionando cada uno el éxito o el fracaso del siguiente (Santa Cruz et al., 2014; Salgado et al., 2013).

La selección de espermática es una parte del proceso que requiere una eficiencia con el fin de garantizar una mayor producción de embriones (Huanca et al., 2014). En camélidos sudamericanos se han descrito dos metodologías de selección espermáticas, Swim-up (Huamán et al., 2011; Ayuque et al., 2013) y gradiente de densidad Percoll y el Androcoll® (Machicado et al., 2009; Berland et al., 2010). Estas dos técnicas son las más comunes para seleccionar espermatozoides en diferentes especies, incluidos los humanos.

La técnica de Swim-up requiere motilidad progresiva de los espermatozoides para su selección. Con esta técnica es posible obtener un alto porcentaje de espermatozoides móviles y morfológicamente normales. Además, es un método de bajo costo, de fácil preparación y no es necesario exponer los espermatozoides a sustancias que puedan ser tóxicas. Aunque, la desventaja es que los eyaculados deben tener espermatozoides de alta concentración y buena motilidad.

El método de gradiente de densidad se basa en el uso de centrifugación y los espermatozoides móviles con mayor densidad específica pueden atravesar diferentes densidades y llegar al fondo del tubo. Su principal ventaja es que se puede utilizar con eyaculados de baja concentración espermática y de motilidad reducida. Aunque, la desventaja es el alto costo y la dificultad de preparar gradientes de densidad (Santa Cruz et al., 2016).

La estandarización de protocolos de fecundación in vitro en Camélidos Sudamericanos sugiere estudiar diferentes métodos de selección espermática que garanticen menor daño espermático principalmente a nivel de membrana, cromatina y ADN nuclear y que posean buena motilidad y concentración del espermática, con el propósito de obtener mayor número de embriones divididos después de la fecundación in vitro. La existencia de muy pocos reportes de producción de embriones in vitro a partir de espermatozoides de alpaca refrigerado. El presente trabajo tiene como objetivo el efecto del uso de dos técnicas de selección espermática en la producción in vitro de embriones de alpaca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la Estación Experimental Agraria Canaán, Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ubicado en el distrito Andrés Avelino Cáceres Dorregaray provincia de Huamanga Departamento de Ayacucho, Perú, a una altitud de 2735 m.s.n.m.

Obtención del material biológico

Los ovarios y testículos de alpacas fueron colectadas del matadero Municipal de Pilpichaca, provincia de Huaytará, Huancavelica, Perú. Los ovarios fueron transportados en solución fisiológica (NaCl 0.9%) suplementado con gentamicina (80 mg/L) en termo aséptico a 37° C, por un tiempo de 4 horas.

Recuperación y selección de ovocitos

Los ovarios en el laboratorio se mantuvieron a 37° C en baño maría (Kossodo, YCW-010E) durante la aspiración folicular. Los folículos de 2 a 7 mm de diámetro fueron aspirados y el líquido folicular fue depositado en tubo cónico, para que después de 15 min de sedimentación, obtener el pellet de ovocitos + células de cúmulus.

La selección de complejo ovocito-cumulus (COCs) se realizó con ayuda de estereoscopio (Motic, modelo: SMZ-168) a 20 a 40X. Los COCS de calidad I, II y III fueron lavados en medio de manipulación y luego colocados en grupos (25 COCs/ poza) medios de maduración preincubadas en placas de 4 pozas (4 well) con 500 µL, siguiendo las recomendaciones de Ratto et al. (2005) (Figura 1B).

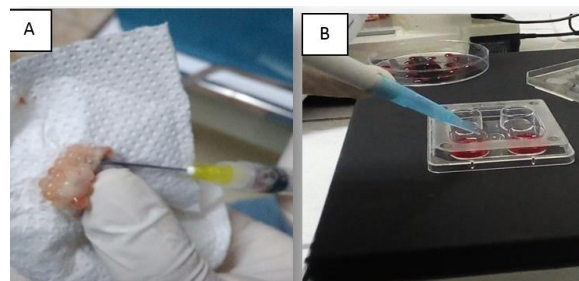


Figura 1. A) Sujeción de ovario de alpaca para la aspiración folicular con jeringa y B) Placas de 4 pozas conteniendo medio de maduración de 500 µL por poza.

Maduración de ovocitos

Los COCS fueron incubados (Bionex, VS-9160GC) por 32h en medio de maduración formulado por: TCM-199, piruvato de sodio (0,011 g/mL), 17-β estradiol (22,2 mg/mL), L-glutamina (0,015 g/mL), FSH (0,5 mg/mL), LH (0,5 mg/mL), SFB (5%), gentamicina (40 mg/ml), a una temperatura de 38.5 °C, en 5% O₂ y 5% CO₂ y 90% de humedad relativa.

Recuperación y selección de espermatozoides

La recuperación de espermatozoides de testículos de matadero se realizó por microcorte de la cola del epidídimo y resuspendidos con dilutor comercial Andromed® al cual se mantuvo a medio ambiente por 10 minutos y luego, llevados a refrigeración a 5° C durante de 32 horas hasta el momento de la selección de espermatozoides realizado por dos técnicas de

selección espermática (Santayana, 2011) previo a la fecundación in vitro.

Selección por gradiente de Percoll. Se preparó una columna de percoll 45/90 en microtubo de 1.5 mL. La formulación de Percoll 90 es a base de Sperm TALP 10X, NaHCO₃ Lactato de sodio, MgCl₂ 6H₂O y CaCl₂.2H₂O. Una muestra espermática diluida (200 µL) se colocó encima de la columna de percoll 45/90. Inmediatamente, se realizó la centrifugación a 700 xg por 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante, luego se adicionó 200 µL de medio Sperm -TALP, para luego centrifugar a 350 xg por 6 minutos. Finalmente se realizó una segunda centrifugación a 350 xg por 6 minutos adicionando 100 µL de medio de capacitación (Sperm -TALP, piruvato de Na, Albumina Sérica Bovina y gentamicina). El pellet obtenido fue resuspendido con medio Fert-TALP suplementado con 6 mg/mL de BSA sin ácidos grasos y 10 mg/mL de heparina, para tener una concentración final de $1,0 \times 10^6$ espermatozoides/mL, siguiendo los protocolos de Ratto et al. (2007) y Berland et al. (2011). Lo pellets con menos de 50% de motilidad fueron eliminadas.

Selección por Swim up. Se preparó en un criovial conteniendo 200 µL de medio Sperm-TALP, al cual se adiciono 200 µL de muestra de espermatozoides y se centrifugó a 350 xg por 6 minutos, se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 200 µL de medio Sperm-TALP y se volvió a centrifugar a 350 xg por 6 minutos, se eliminó el sobrenadante. El pellets se volvió a resuspender con 50 µL de medio Fert-TALP, con ayuda de una micropipeta fueron depositado a la base de un criovial de 1.5 ml que contiene medio FIV, y se llevó a incubación, colocándose en una posición de 45° de inclinación por 30 minutos y una temperatura de 38.5°C en incubadora (Bionex, VS-9160GC), para que los espermatozoides motiles migren hacia la superficie. Luego se recolecto 800 µL de la fracción superior de cada tubo Eppendorf y se colocaron en 2 mL de Fert-TALP en un tubo cónico de 15 ml y se centrifugaron dos veces a 1500 RPM durante 6 min). El pellet obtenido fue resuspendido con medio Fert-TALP suplementado con 6 mg/mL de BSA sin ácidos grasos y 10 mg/mL de heparina, para tener una concentración final de $1,0 \times 10^6$ espermatozoides/mL, siguiendo los protocolos de Shamsuddin et al. (2014).

Fecundación in vitro

Los espermatozoides seleccionados por técnica de gradiente de Percoll y Swim up y los ovocitos fueron incubados y cultivados por un tiempo de 18 h, siguiendo los protocolos Huanca et al. (2014).

Cultivo in vitro

Finalizada las 18h de incubación espermatozoides y ovocito, los ovocitos fueron desnudados de las células del cumulus por pipeteo. Posteriormente, los presuntos cigotos fueron cultivados en medio SOFaa a una atmósfera de 38.5°C, 5% O₂ y 5% CO₂ y 90% de humedad relativa, por un tiempo de siete días, para finalmente ser evaluados según calidad de embriones (Bó y Mapletoft, 2018) (Figura 2).

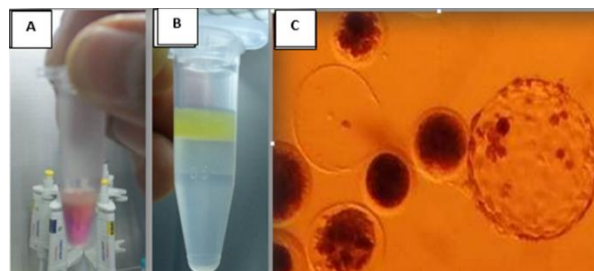


Figura 2. A) Microtubo con medio para selección de espermatozoides por Swim up, B) Microtubo con columna de percoll para la selección de espermatozoides por gradiente de Percoll y C) Blastocisto protruido de alpaca a los 7 días post fecundación.

Análisis estadístico

Para la comparación de las variables en el uso de técnicas de selección de espermatozoides se utilizó la prueba de t de student. La variable calidad embrionaria fue comparada de las dos técnicas de selección con la prueba de Chi cuadrado. Lo análisis de los datos se realizó utilizando el paquete Statistical Analysis Systems (SAS, v9.2).

RESULTADOS

De un total de 370 ovarios se recuperaron 1137 ovocitos, haciendo un promedio de 3,6 ovocitos/ovario. Los COCs evaluados y utilizados en FIV, estaban distribuidos en 46.08 ± 8.93 , 41.34 ± 18.00 y $12.58 \pm 3.58\%$ de categoría I, II y III, respectivamente.

Los espermatozoides recuperados del epidídimo tenían una concentración de 92×10^6 espermatozoides/mL y una motilidad de 60%. Sometido a las técnicas de selección espermática, la concentración (102×10^6 /ml y 32×10^6 /ml) y motilidad (70 y 70%) para gradiente de percoll y swim up, respectivamente.

A 7 días en cultivo, la tasa de blastocistos fue de $8,43 \pm 6,04\%$ y $3,89 \pm 1,75\%$, para ovocitos fecundados con espermatozoides seleccionados con gradiente de Percoll y Swim up, respectivamente, no encontrándose diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$), entre los grupos.

Tabla 1. Porcentaje de mórulas y blastocistos obtenidos al día 7 de cultivo in vitro con espermatozoides seleccionados con gradiente de percoll y swim up en alpaca (Vicugna pacos).

Estado de Desarrollo	Percoll		Swim up	
	n	Media ± DE, %	n	Media ± DE, %
Ovocitos	499		361	
Mórulas (D7)	64	15.80 ± 6.86 ^a	44	11.54 ± 5.79 ^a
Blastocistos (D7)	44	8.43 ± 6.04 ^a	12	3.89 ± 1.75 ^a
Día 7 (mórulas + blastocistos)	108	21.60 ± 13.89 ^a	56	14.79 ± 7.04 ^a

^{a-b} Letras diferentes entre columnas representan diferencias significativas ($p < 0,05$).

El análisis estadístico de la calidad morfológica de las mórulas y blastocistos producidos in vitro al día 7 en cultivo, muestra que no existe diferencia estadística ($p > 0.05$) en los dos grupos a la prueba de Chi cuadrado (ver tabla 2 y 3).

Tabla 2. Calidad de mórulas, según técnica de selección espermática en alpacas.

Categoría	Percoll		Swim up	
	n	%	n	%
Excelente	14	21.88	12	27.27
Buena	33	51.56	25	56.82
Regular	13	20.31	4	9.09
Malo	4	6.25	3	6.82

Tabla 3. Calidad de blastocistos, según técnica de selección espermática.

Categoría	Percoll		Swim up	
	n	%	n	%
Excelente	17	38.64	3	25.00
Buena	16	36.36	8	66.67
Regular	8	18.18	1	8.33
Malo	3	6.82	0	0.00

DISCUSIONES

En el presente trabajo de investigación, la tasa de blastocistos fue de $8,43 \pm 6,04\%$ y $3,89 \pm 1,75\%$, para ovocitos fecundados con espermatozoides seleccionados con gradiente de Percoll y Swim up, respectivamente ($p > 0.05$). Resultados similares reporta Ruiz et al. (2017), utilizando espermatozoides de dos técnicas de selección de espermatozoides (Swim-up y gradiente de Percoll) no encontraron influencia en la tasa de blastocistos. Además, Mamani (2015) evaluando dos métodos de selección espermática (swim-up y washing) no encontraron efecto en la tasa de fecundación (35.17 y 36.82%), respectivamente. Nuestros resultados son superiores a los reportados por Gamarra et al. (2008), quienes reportaron 8% de mórulas e inferiores a 86% de mórulas reportados por Huamán et al. (2011).

Santa Cruz et al. (2016) al comparar las dos técnicas de selección (Androcoll, Percoll y Swim-up) obtuvo una mejor motilidad progresiva y funcionalidad de membrana con ambos coloides, en comparación con Swim-up. Asimismo, Conde et al. (2008), Morrell et al. (2009), Ruiz et al. (2010) y Trasorras et al. (2017) observaron un aumento de la motilidad progresiva en muestras seleccionadas con Androcoll y percoll

La mayoría de los estudios de fecundación in vitro realizados en llamas y alpacas se han realizado utilizando espermatozoides epididimarios y procesados por gradientes de Percoll 45/90 o Androcoll (Del Campo et al., 1994; Ratto et al., 2007; Berland et al., 2011; Trasorras et al., 2012). En este estudio, el método de selección de espermatozoides de alpaca no afectó la tasa de desarrollo a blastocistos. Siendo similar a los resultados reportados en bovinos por Parrish et al. (1995) y Seidel et al. (1995)

El método de selección de espermatozoides, Swim-up y Percoll, proporcionan poblaciones de espermatozoides

morfológicamente normales con una alta motilidad progresiva que puede desempeñar un papel importante en la producción de embriones in vitro. Para Mendoza et al. (2008) la técnica de selección espermática "swim-up" presenta varias ventajas, reduce el tiempo y el número de centrifugaciones y minimiza el daño a los espermatozoides.

CONCLUSION

La fecundación in vitro de ovocitos de alpaca con espermatozoides seleccionadas con dos técnicas de selección (percoll y swim up) no influyen significativamente en la cantidad y calidad de mórulas y blastocistos al día 7 de cultivo embrionario.

Agradecimientos

Al Programa de Investigación en Camélidos Sudamericanos del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) por los insumos y materiales y equipos brindados. Al MVZ. Rubén Herberth Mamani Cato por el apoyo en el análisis estadístico.

Contribuciones de autores

Preparación y ejecución: (Mijail Contreras), Desarrollo de la metodología: (Mijail Contreras, Mariluz Naveros) Concepción y diseño: (Mijail Contreras, Mariluz Naveros, César Olaguivel) Edición del artículo (Mijail Contreras, Mariluz Naveros, César Olaguivel) Supervisión del estudio: (Mijail Contreras, César Olaguivel)

Conflictos de intereses

Los autores firmantes 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 manuscrito.

REFERENCIAS

1. Ayuque A, A., y Justiniano H, E. C. Evaluación de diferentes tiempos para la maduración nuclear de ovocitos de llama (lama glama) en el desarrollo de embriones producidos por fecundación in vitro; 2013. <http://repositorio.unh.edu.pe/handle/UNH/752>
2. Berland MA, Von Baer A, Ruiz J, Parraguez VH, Morales P, Adams GP, et al. In vitro fertilization and development of cumulus oocytes complexes collected by ultrasound-guided follicle aspiration in superstimulated llamas. *Theriogenology*. 2011;75(8):1482-8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.047>
3. Berland MO, von Baer A, Ruiz J, Parraguez V, Morales P, Adams GP, Ratto MH. In vitro fertilization and development of cumulus oocyte complexes collected by ultrasound-guided follicular aspiration in superstimulated llamas. *Theriogenology* 2011; 75: 1482-1488. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.047>
4. Bó GA, Maplettoft RJ. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim Reprod AR*. 2018; 10(3):344-8.
5. 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. 2008;109(1-4):298-308. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.10.004>
6. Condori RL, Huanca W, Chileno M, Cainzo J, Valverde F, Becerra JJ, et al. 252 effect of follicle-stimulating hormone addition on in vitro maturation and cleavage of alpaca (*vicugna pacos*) embryos. *Reprod Fertil Dev.* 2010;23(1):224-224. <https://doi.org/10.1071/RDv23n1Ab252>
 7. 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(6):1219-29. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90479-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90479-3)
 8. Gamarra G, Huaman E, León S, Carpio M, Alvarado E, Asparrin M, et al. 157 First in vitro embryo production in alpacas (*Lama pacos*). *Reprod Fertil Dev.* 2008;21(1):177-8. <https://doi.org/10.1071/RDv21n1Ab157>
 9. Huamán E, Tidlacuri F, Landeo L, Ruiz J. Efecto de la atmósfera de cultivo sobre el desarrollo de embriones de alpacas producidos por fecundación in vitro. XXXIV Reunión Científica Anu Asoc Peru Prod Anim. 201
 10. Huanca W, Condori R, Cainzos J, Chileno M, Quintela L, Becerra J, et al. 341 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.* 2009;22 (1):327-327. <https://doi.org/10.1071/RDv22n1Ab341>
 11. Huanca W, Condori R, Chileno M, García P, Cainzo J y Becerra J. Evaluación de cuatro tiempos de cultivo sobre la tasa de maduración y división posfecundación in vitro de ovocitos de alpaca. *Rev Inv Vet Perú.* 2014;25(4):468-76. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10782>
 12. Huanca W, Condori RL, Chileno MA, Cainzos J, Becerra JJ, Quintela LA, et al. 211 in vivo maturation and in vitro fertilization of alpaca oocytes. *Reprod Fertil Dev.* 2010;23 (1):204-5. <https://doi.org/10.1071/RDv23n1Ab211>
 13. Machicado, R.; Delgado, P. y Flores, M. Descripción del proceso de fertilización in vitro de ovocitos de llama (*Lama glama*) obtenidos por súper estimulación ovárica con eCG y fertilizados con semen tratado con proteasa. V Congreso Mundial sobre Camélidos. Riobamba, Ecuador. 2009.
 14. Mamani MGD. Métodos de selección espermática y tasa de fecundación in vitro en ovocitos de alpaca (*Vicugna pacos*). 2015. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/1830>
 15. Mendoza J, Ayuque A, Trivinio F, Ayuque G, Landeo L, Ruiz J. Evaluación de dos métodos de recuperación de espermatozoides epididimarios para la fecundación in vitro de ovocitos de alpacas. XXXI Reunión científica de la Asociación Peruana de 434 Producción Animal. Lima. Perú. 2008; pp.54.
 16. Morrell JM, Dalin AM, Rodriguez-Martinez H. Comparison of density gradient and single layer centrifugation of stallion spermatozoa: yield, motility and survival. *Equine Vet J.* enero de 2009;41(1):53-8. <https://doi.org/10.2746/042516408X322139>
 17. Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology.* 1995;44(6):859-69. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00271-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00271-9)
 18. Ratto M, Berland M, Huanca W, Singh J, Adams GP. In vitro and in vivo maturation of llama oocytes. *Theriogenology.* 2005; 63(9):2445-57. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.053>
 19. Ratto M, Gomez C, Berland M, Adams GP. Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Anim Reprod Sci.* 2007;97(3-4):246-56. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.02.002>
 20. Ratto MH, Gomez C, Berland MO, Adams GP. Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Anim Reprod Sci* 2007; 97: 246-256 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.02.002>
 21. Rho GJ, Hahnel AC, Betteridge KJ. Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos in vitro. *Theriogenology.* 2001;56(3):503-16. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00581-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00581-7)
 22. Ruiz J, Santayana RP, Mendoza MJ, Landeo JL, Huamán E, Tidlacuri F, et al. Effect of oocyte maturation time, sperm selection method and oxygen tension on in vitro embryo development in alpacas. *Theriogenology.* 2017;95:127-32. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.006>
 23. Ruiz J., Correa J. y Martínez M. Vitrificación de ovocitos bovinos y su uso en el desarrollo partenogenético de embriones. *Arch Med Vet;* 2010; 42: 79-83. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2010000100011>
 24. Salgado R, Simanca J y Vergara O. Efecto del factor de crecimiento epidermal (EGF) sobre la maduración de ovocitos bovinos cultivados in vitro. *Revista científica, FCV-LUZ.* 2013;23(4):325-8. 7.
 25. Samardzija M, Karadjole M, Getz I, Makek Z, Cergolj M, Dobranic T. Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development in vitro. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006;4(1):1-7.
 26. Santa Cruz C, Huanca W, Condori R y Ampuero A. Uso de macromoléculas sobre la tasa de maduración y desarrollo embrionario in vitro de ovocitos bovinos. *Rev Inv Vet Perú.* 2014;25(4):487-93. 6. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10799>
 27. Santa Cruz R, Giuliano SM, Gambarotta MC, Morrell JM, Abraham MC, Miragaya MH, et al. Comparison of different methods of sperm selection of llama raw semen. *Anim Reprod Sci.* 2016;173:8-12. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.08.001>
 28. Santayana P. Tiempo de maduración de ovocitos *Vicugna pacos* «alpaca» en el desarrollo embrionario por fecundación in vitro. Ayacucho-Perú [[Tesis Pregrado]]. [Huancavelica]: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad de Ciencias Biológicas; 2011. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.053>
 29. Seidel GE, Leipold SD, Shawki H. Preparation of bovine sperm for in vitro fertilization by swim-up or centrifugation through Percoll or BSA. *Theriogenology.* 1995;1(43):319.
 30. Shamsuddin M, Rodriguez-Martinez H, Larsson B. Fertilizing capacity of bovine spermatozoa selected after swim-up in

- hyaluronic acid-containing medium. *Reprod Fertil Dev* 1993; 5: 307–315.
31. Trasorras V, Giuliano S, Chaves G, Neild D, Agüero A, Carretero M, et al. In vitro Embryo Production in Llamas (*Lama glama*) from In vivo Matured Oocytes with Raw Semen Processed with Androcoll-E using Defined Embryo Culture Media. *Reprod Domest Anim.* 2012;47(4):562-7. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01917.x>
32. Trasorras, VL, Carretero, MI, Neild, DM, Chaves, MG, Giuliano, SM y Miragaya, MH. Producción, conservación y transferencia de embriones de camélidos sudamericanos. *Fronteras en la ciencia veterinaria*, 2017; 4, 190. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00190>