

## EVALUACIÓN DE CUATRO TIEMPOS DE MADURACION IN VITRO EN OVOCITOS DE ALPACA SOBRE LA TASA DE MADURACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO

### Evaluation of four times of maturation in vitro in alpaca oocytes on the rate of maturation and embryonic development

Daniel Gandarillas Espezúa<sup>1</sup>, Rosario Ríos Bobadilla<sup>1</sup>, Abel Quispe Quispe<sup>1</sup>, Edith Torres Hualla<sup>1</sup>, Angelina Puma Iquise<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Reproducción Animal, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna-Perú.

\* Corresponding author: Angelina Puma Iquise, e-mail: [apumai@unjbg.edu.pe](mailto:apumai@unjbg.edu.pe)

Recibido: 11/02/2022

Aceptado: 19/05/2022

Publicado: 31/07/2022

#### ABSTRACT

The objective was to evaluate the maturation time to obtain oocytes in Metaphase II (MII) stages and the rate of division and blastocysts after fertilization in alpacas. For this, the ovaries were obtained from benefited animals. Experiment 1: 441 oocytes were distributed in four times (26, 32, 38 and 42 hours) and matured in TCM-199. At the end of the maturation time, the oocytes were fixed in an ethanol solution: acetic acid (3:1) and stained with aceto-orcein (1%). Experiment 2: 959 oocytes were cultured under the same conditions as experiment 1 and fertilized with sperm obtained by artificial vagina and selected by the Swim Up method. At the end of the fertilization time, the presumed zygotes were cultured in SOFaa medium for 7 days. In experiment 1, 39.6 ± 8.0, 49.1 ± 18.6, 45.9 ± 9.1 and 38.2 ± 9.9% of oocytes were obtained in Metaphase-II for 26, 32, 38 and 42 h of maturation, respectively, without statistical difference ( $p > 0.05$ ). In experiment 2, the cleavage rate was 45.7 ± 3.5, 51.3 ± 10.2, 52.8 ± 5.6 and 50.9 ± 3.1 with no statistical difference between treatments ( $P > 0.05$ ) and the blastocyst rate was 20.5 ± 3.4, 30.5 ± 5.8, 21.2 ± 2.5 and 22.8 ± 3.5 for 26, 32, 38 and 42 hours, respectively, with a statistical difference between 32 hours and 26, 38 and 42 hours ( $p < 0.05$ ). The results obtained suggest that 32 hours of maturation are required to obtain 30.5% of blastocysts.

**Keywords:** alpaca, blastocysts, cleavage, maturation.

#### RESUMEN

El objetivo fue evaluar diferentes tiempos de maduración in vitro (MIV) en ovocitos de alpaca sobre las tasas de maduración (Metafase II, MII), de clivaje y de blastocistos post fecundación. Para esto, los ovarios fueron obtenidos de animales beneficiados. Experimento 1: 441 ovocitos fueron distribuidos al azar en cuatro tiempos de MIV (26, 32, 38 y 42 horas) en TCM-199. Culminado el tiempo de maduración, los ovocitos fueron fijados en solución etanol: ácido acético (3:1) y teñidos con aceto-orceína (1%). Experimento 2: 839 ovocitos fueron cultivados bajo las mismas condiciones del experimento 1 y fertilizados con espermatozoides obtenidos por vagina artificial y seleccionados por el método Swim Up. Culminado el tiempo de fertilización los presuntos cigotos fueron cultivados en medio SOFaa durante 7 días. En el experimento 1 se obtuvo 39.6 ± 8.0%, 49.1 ± 18.6%, 45.9 ± 9.1% y 38.2 ± 9.9 % de ovocitos en MII para 26, 32, 38 y 42 h de maduración respectivamente, sin diferencia estadística ( $p > 0.05$ ). En el experimento 2, la tasa de división fue de 45.7 ± 3.5%, 51.3 ± 10.2%, 52.8 ± 5.6% y 50.9 ± 3.1% sin diferencia estadística entre tratamientos ( $p > 0.05$ ) y la tasa de blastocistos fue de 20.5 ± 3.4%, 30.5 ± 5.8%, 21.2 ± 2.5% y 22.8 ± 3.5% para 26, 32, 38 y 42 h respectivamente, siendo significativamente mayor el porcentaje de blastocistos a las 32 h respecto al resto de los tiempos ( $p < 0.05$ ). En conclusión, de los tiempos ensayados en este estudio en ovocitos de alpaca, 32 horas de MIV sería el indicado, permitiendo obtener un 30.5% de blastocistos.

**Palabras clave:** alpaca, blastocistos, clivaje, maduración.

## INTRODUCCION

Los programas de maduración de ovocitos y fertilización in vitro (FIV), tienen como objetivo final la producción de embriones de alta calidad, que puedan producir gestaciones normales y nacimientos, luego de la transferencia de tales embriones a hembras receptoras (Khatir y Anouassi, 2006).

Tales programas constan de tres fases fundamentales, las cuales independientemente del protocolo utilizado, en orden cronológico son: maduración de ovocitos, fecundación y cultivo de embriones in vitro. Estas tres fases, involucran procesos fisiológicos y químicos, como el reinicio de la meiosis, y la maduración citoplasmática del ovocito (Hafez y Hafez, 2002), un fracaso en esta etapa condiciona el éxito de la siguiente etapa (Mucci et al., 2006).

La maduración in vitro de ovocitos es una tecnología de reproducción asistida, que implica una maduración nuclear y una maduración citoplasmática, siendo una secuencia compleja, regulada por parámetros endocrinos y por la interacción entre el ovocito y el folículo (Smith, 2001). Al inicio de la maduración, el núcleo del ovocito primario se encuentra bloqueado en la profase de diploteno de la primera división meiótica, estadio de vesícula germinal (VG). En respuesta a la elevación preovulatoria de la LH, el ovocito reinicia la división meiótica (Gordon, 1994). Cuando los ovocitos son colectados de los folículos, estos se encuentran en estadio de VG (ovocito inmaduro) y, tras el proceso de maduración nuclear, alcanzarán el estadio de metafase II (ovocito maduro) (Edwards, 1965). Es por ello, que el tiempo de maduración in vitro es necesario para que el ovocito alcance la segunda metafase (MII).

En el animal vivo, en alpacas la ovulación está dentro del rango de 24 a 48 horas después de la copula (Ratto et al., 2006) y con tratamiento como la GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) ovulan dentro de 25 a 26 horas y con plasma seminal ovulan en un rango de 24 y 30 horas (Huanca, 2014). En estudios previos en alpacas reportaron 19, 43 y 66% de los ovocitos alcanzaron la etapa de MII después de 30, 34 y 38 h de maduración in vitro (Huanca et al., 2009). Posteriormente, Condori et al. (2010) realizaron la MIV por 42 horas obteniendo 55.96% de ovocitos en MII, 36.16% de división y 14.73% de blastocistos. Huanca et al. (2014) evaluaron nuevamente estos tiempos de maduración, encontrando 26.3, 52.6, 68.5 y 75.3% de ovocitos en MII y 9.5, 8.1, 15.6 y 19.8% de tasa de clivaje a los 30, 34, 38 y 42 horas de MIV, respectivamente en otro estudio realizado por Ruiz et al. (2017) reportaron que los ovocitos pueden alcanzar la maduración nuclear después de 24, 28 y 32 horas, resultando en 59.5, 62.2 y 79.3% de ovocitos en MII y 13.2, 16.6 y 23.1% de blastocistos después de la fecundación in vitro.

Cuando el tiempo de MIV es prolongado los ovocitos empiezan a envejecer mostrando un aumento de la anomalía cromosómica y disfunción de los orgánulos celulares, siendo esto un factor que influye en la calidad de los ovocitos (Igarashi et al., 2015).

Hasta el momento los diferentes tiempos de maduración in vitro de los ovocitos en alpacas han presentado resultados variables, siendo esta una etapa el inicio para el éxito de la

obtención de embriones in vitro. El presente estudio tiene como objetivo evaluar cuatro tiempos de MIV sobre las tasas de maduración, división y porcentajes blastocistos obtenidos post fecundación in vitro en alpacas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar de estudio

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, ubicado a una altitud de 599 m, en la provincia y distrito de Tacna, Perú; donde la temperatura fluctúa entre 22 a 30 °C en verano (diciembre-febrero) y 10 a 24 °C en invierno (junio-agosto). El presente estudio se realizó en los meses de diciembre-marzo del año 202.

### Obtención de muestras

Se colectaron ovarios de alpacas adultas, sacrificadas en el camal municipal del distrito de Masacruz, Puno. Los ovarios se colocaron en un termo conteniendo solución salina 0.9% (NaCl) + gentamicina (80 µg/ml), a 30 °C, y fueron transportados al laboratorio dentro de las 10 a 12 horas siguientes. Para obtener los complejos cumulus ovocitos (CCOs) los folículos con diámetro de 2 a 6 mm fueron aspirados mediante una jeringa de 10 ml estéril con una aguja de 21G. Luego de la aspiración, el contenido fue colocado en una placa Petri (90 x 15 mm) mantenida a 37 °C. Para la búsqueda de los CCOs se utilizó un estereomicroscopio a 40X y se clasificaron en 4 grados (1 a 4) según el número de capas de células del cúmulo y la apariencia del citoplasma del ovocito, criterios señalados por Bertoldo et al. (2010). Es importante mencionar que en este estudio solo se utilizaron los CCOs de grado 1 y 2. Los grados fueron:

- 1: COCs que presentan más de tres capas de células del cúmulo compactas y el citoplasma homogéneo.
- 2: COCs con 2 a 3 capas de células del cúmulo compactas y un citoplasma homogéneo
- 3: COCs parcialmente desnudos, con citoplasma heterogéneo, con presencia de vacuolas
- 4: COCs con células de los cúmulos expandido y con citoplasma heterogéneo.

### Experimento 1: Maduración in vitro

En la evaluación de la tasa de maduración se utilizaron 441 ovocitos que se distribuyeron al azar de la siguiente manera: Tratamiento 1 (n=101): 26 horas; Tratamiento 2 (n=108): 32 horas; Tratamiento 3 (n=114): 38 horas y Tratamiento 4 (n=118): 42 horas. Para la maduración se empleó el medio TCM-199, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 0.5 µg/ml de FSH, 1 µg/ml de estradiol, 0.3 mM de piruvato de sodio, 50 µg/ml de gentamicina y 1% de aminoácidos esenciales y no esenciales.

El medio de maduración fue colocado en placas de 4 pocillos, donde se colocó 500 µl a cada pocillo y colocado en la incubadora de CO<sub>2</sub> por lo menos dos horas antes de su uso. Los ovocitos se lavaron tres veces en medio de lavado pre-maduración (TCM-199, suplementado con 10% de SFB, 0.3 Mm de piruvato de sodio y 50 µg/ml de gentamicina) y luego, se colocaron 50 ovocitos por pocillo. La maduración in vitro se realizó en incubadora de CO<sub>2</sub>, a 39 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y

humedad relativa alta, considerando los tiempos de cultivo para cada tratamiento.

Luego de la maduración, los ovocitos fueron colocados en solución PBS suplementada con 10% de SFB y 1 mg/ml de hialuronidasa. Se eliminaron las células del cúmulo mediante aspiraciones y espiraciones suaves con la ayuda de una micropipeta y los ovocitos desnudos fueron colocados de 6 a 10 ovocitos por lamina, cubiertos con un cubreobjeto sujeto en las cuatro puntas con acetona y colocados en una solución de fijación conteniendo etanol y ácido acético (3:1), y almacenados a 4 °C en refrigeración por 24 h.

Para la tinción, se agregó orceína al 1%, permitiendo que la solución penetre entre el porta y cubreobjetos por capilaridad. Finalmente, y con ayuda de un microscopio invertido con objetivo a 20x se determinaron los estadios de maduración nuclear de los ovocitos, considerándose vesícula germinar rota (GVBD), vesícula germinal (VG), metafase I (MI), anafase-telofase I, metafase II (MII) y degenerados.

### Experimento 2: Fecundación in vitro

Para la evaluación de la tasa de división pos-fecundación se utilizaron 839 ovocitos. Los ovocitos fueron sometidos a los mismos tiempos de maduración del experimento 1 y fecundados con espermatozoides obtenidos por vagina artificial incorporada a un maniquí. El semen fue diluido en relación de 1:1 con dilutor comercial Sterdyl y no se adicióno enzimas exógenas para disminuir la filancia de la muestra. Luego de cumplirse cada tiempo de maduración, se procedió a retirar y lavar los ovocitos tres veces. Posteriormente, se colocaron 50 ovocitos por cada pocillo de fecundación y fueron mantenidos en la incubadora de CO<sub>2</sub> a 39 °C por 30 min previo a la adición de los espermatozoides. Los espermatozoides fueron separados y capacitados mediante la técnica swim up, para obtener una concentración final de 4x10<sup>6</sup> espermatozoides vivos por ml y se agregó 2 µl de la

suspensión de espermatozoides a los pocillos de fecundación. Luego se realizó un co-cultivo por 18 h a 39 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y bajo condiciones de máxima humedad.

El cultivo in vitro se realizó en medio SOFaa, preparado en los pocillos de 500 µl y mantenido en incubadora de CO<sub>2</sub>, por lo menos 2 horas antes de su uso. Al término del co-cultivo, los presuntos cigotos fueron retirados y se procedió a eliminar los espermatozoides adheridos mediante aspiraciones, colocando 50 cigotos por pocillo. El desarrollo del embrión se evaluó el día 2, 5 y 7 del cultivo in vitro (día 0 = fertilización in vitro) figura 1.

### Análisis Estadístico

Para determinar diferencias entre los tratamientos sobre la tasa de maduración, clivaje y tasa de blastocistos, se utilizó un análisis de varianza (ANVA). Para determinar las diferencias entre medias de tratamientos se utilizó la prueba Tukey con nivel de significancia de 0.05. Previamente los datos fueron evaluados para determinar normalidad empleando el estadístico de Shapiro-Wilks, en ausencia de normalidad, se utilizó la prueba KRUSKAL-WALLIS y para determinar las diferencias entre medias de tratamientos se utilizó la prueba Dunn. Se empleó el estadístico R (Versión 4.1.1).

## RESULTADOS

### Tasa de ovocitos en Metafase II (%)

El porcentaje de maduración in vitro de ovocitos de alpacas sometidos a cuatro tiempos de maduración se muestra en la tabla 1. Aunque, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos en MII entre las diferentes horas de maduración ( $p > 0.05$ ), se observó un mayor porcentaje a las 32 h.

**Tabla 1.** Tasa porcentual en los diferentes estadios de maduración nuclear en ovocitos de alpacas.

Tiempo de maduración de ovocitos	(VGBR)	VG	Anafase	telofase	Metafase I	Metafase II*	Degenerado
T1 (n=101)	14.8 ± 0.6	13.8 ± 2.2	7.9 ± 2.6	7.0 ± 2.9	9.8 ± 3.4	39.6 ± 8.0	6.7 ± 5.3
T2 (n=108)	14.6 ± 5.6	3.8 ± 3.9	4.6 ± 3.3	7.4 ± 4.3	10.3 ± 6.3	49.1 ± 18.6	10.1 ± 8.8
T3 (n=114)	15.9 ± 4.5	0	7.7 ± 7.7	5.6 ± 6.4	11.7 ± 5.9	45.9 ± 9.1	14.0 ± 7.9
T4 (n= 118)	12.6 ± 6.5	15.2 ± 7.5	5.0 ± 4.5	8.4 ± 6.6	10.0 ± 7.5	38.2 ± 9.9	10.1 ± 6.9

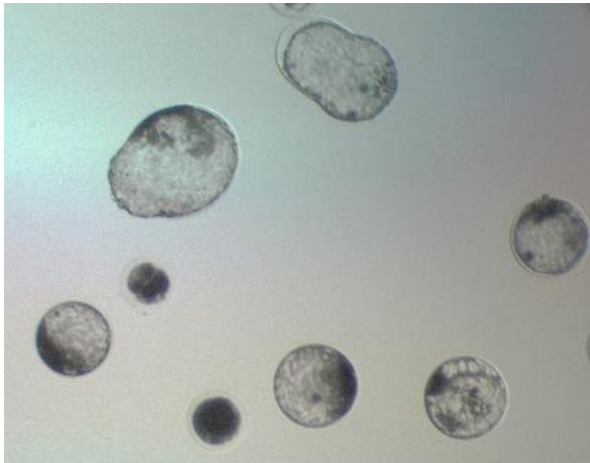
Sin diferencia estadística entre tratamientos

**Tabla 2.** Tasa de clivaje y de blastocistos producidos *in vitro* de alpacas utilizando diferentes tiempos de maduración (26, 32, 38 y 42 h).

Tiempo de maduración	Ovocitos (n)	División 8%	Blastocistos (%)
T1 (26 h)	214	45.7 ± 3.5	20.5 ± 3.4 <sup>a</sup>
T2 (32h)	217	51.3 ± 10.2	30.5 ± 5.8 <sup>b</sup>
T3 (38 h)	202	52.8 ± 5.6	21.2 ± 2.5 <sup>a</sup>
T4 (42 h)	206	50.9 ± 3.1	22.8 ± 3.5 <sup>a</sup>

### Tasa de producción embriones (%)

No se observaron diferencias significativas en las tasas de división entre los tiempos de maduración in vitro ensayados ( $p > 0.05$ ). Mientras que, se observó una tasa de blastocistos significativamente mayor con 32 h de MIV respecto al resto de los tiempos de maduración (26, 38 y 42 h) ( $p < 0.05$ ) (ver tabla 2).



**Figura 1.** Embriones de alpaca producidos in vitro, día 7 post fecundación.

## DISCUSIÓN

En contraste con publicaciones previas en alpacas, Huanca et al. (2009), encontraron una mayor tasa de maduración a las 38 h (65.8%), así mismo, Huanca et al. (2014) a 38 y 42 h de MIV reportaron 68.5% y 75.3% de ovocitos en MII, respectivamente. Por otro lado, Ruiz et al. (2017) obtuvieron una mayor tasa de maduración de 65.1% a 32 h de MIV. Ratto et al. (2005) en llamas encontraron una tasa de maduración nuclear de 77.7%, 80.6% y 80.4% a las 28, 30 y 36 h, respectivamente. Sin embargo, estos valores son superiores con respecto al presente estudio. La baja tasa de maduración de los ovocitos obtenidos podría deberse a que los autores adicionaron en el medio de maduración 10 ug/ml de hCG (Huanca et al., 2009; Huanca et al., 2014; Condori et al., 2010; Ratto et al., 2005). La hormona hCG actúa cinco veces más que la hormona LH con presencia de la FSH, aumentando la producción de AMPc dentro del ovocito, lo cual cumple el rol de la regulación del ciclo meiótico (Casarini et al., 2016). Con respecto a Ruiz et al. (2017) se debería al tiempo de traslado de las muestras del matadero al laboratorio, que fue de 40 min aproximadamente a 35 °C y Ratto et al. (2005) en 5 horas con 25.8°C, en el presente estudio se realizó dentro de 10-12 horas a 30°C. Existen evidencias tanto en equinos y bovinos que mantener los ovarios a temperaturas de 35 a 37 °C y durante pocas horas de post mortem puede aumentar la capacidad del desarrollo del ovocito (Hinrichs et al., 2005; Ribeiro et al., 2008). Un estudio realizado por Arriaga et al. (2014) en alpacas conservo ovarios por 16 horas a 12-15°C y 22-25°C, obteniendo como resultado en la tasa de MIV de 47.9 y 32.7%, respectivamente, por tanto, la temperatura y el tiempo tuvo un efecto sobre la maduración in vitro de los ovocitos.

Con respecto a la tasa de clivaje los resultados encontrados son superiores a los reportados previamente en alpacas por Huanca et al. (2009) 15.4% a 38h, Condori et al. (2010) 36.16% a 42 h y Huanca et al. (2014) 15.6 y 19.8% con 38 y 42 h respectivamente. Estas diferencias podrían deberse a que los autores emplearon para FIV con espermatozoides obtenidos de epidídimos de animales beneficiados, la desventaja que presentaría que estas muestras experimentan pérdida de motilidad con el tiempo desde el beneficio (Banda et al., 2010), lo cual influiría en la fertilización in vitro. A

diferencia del presente estudio que se empleó con semen fresco colectado por vagina artificial, el cual está compuesto por componentes necesarios (proteínas, antioxidantes y fuentes energéticas) presentes en el plasma seminal, que favorecerían la capacidad de fertilización del espermatozoide (Maxwell et al., 2007). Otro factor de variación puede deberse al medio de cultivo empleados. Donde, los autores mencionados utilizaron el medio KSOM la cual contiene menor concentración de piruvato y glucosa a comparación del SOF-AA estos componentes son fuentes de energía para los embriones en desarrollo; siendo el piruvato fuente de nutriente para los embriones de 2 a 16 células y la glucosa como fuente de energía para las mórulas y los blastocistos (Thompson y Peterson, 2000). Esta afirmación es consistente con los resultados de Catari (2018) en alpacas y Nedambale et al. (2004) en bovinos.

Por otro lado, la tasa de clivaje es inferior a los resultados de Ruiz et al. (2017), quienes reportan 79.3% a 32 h de MIV. Sin embargo, encontraron una menor tasa de blastocistos de 23.1%, siendo inferior a los resultados encontrados (30.5% a 32 de MIV). Esta diferencia puede estar vinculada con la fuente espermática utilizada en FIV, ya que estos autores emplearon espermatozoides del epidídimo. Además, los resultados sobre tasas de blastocistos son superiores a los reportes de Gamarra et al. (2008) (8%), Condori et al. (2010) (14.73%) y Contreras et al. (2021) (8.43 y 3.89%), esta diferencia puede deberse a la fuente de semen utilizado en FIV, el medio de cultivo, tiempo de MIV, entre las principales. Gamarra et al. (2008) y Contreras et al. (2021), emplearon semen congelado y refrigerado, respectivamente, los cuales pueden presentar daños a nivel de material genético, puesto que, espermatozoides afectados poseen una capacidad reducida en la formación de blastocistos (Hansen et al., 2010).

Es importante remarcar que a pesar de que no se encontró una diferencia estadística en la tasa de maduración entre los diferentes tiempos, numéricamente hubo una mayor tasa a las 32 horas, lo cual se vio reflejado en una mayor tasa de blastocistos.

Las tasas bajas de MIV obtenidas al emplear tiempos de 42 h podrían deberse a que los ovocitos tienden a envejecer. Cuando los ovocitos envejecen y son fecundado, afecta la tasa de fertilización y el desarrollo del embrión (Miao et al., 2009), a esto se añade también que la maduración anormal del citoplasma puede asociarse con un porcentaje bajo de blastocistos, a pesar de que la maduración nuclear haya ocurrido (O' Brien et al., 1996).

## CONCLUSIONES

De los tiempos ensayados en este estudio en ovocitos de alpaca, 32 horas de MIV sería el indicado, permitiendo obtener un mayor porcentaje de blastocistos.

## Agradecimiento

Esta investigación fue financiada por fondos de canon, sobre canon y regalías mineras otorgado a la Universidad Nacional Jorge Basadre de Grohoman, Tacna, Perú.

## Contribuciones de autores

Preparación y ejecución: (DG, AP, ET, AQ), Desarrollo de la metodología: (AP, ET, AQ), Concepción y diseño (AP). Edición del artículo (RR). Supervisión del estudio (DG).

### Conflictos de interés

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

- Arriaga I, Huanca W, Terreros M, Becerra J, García P, Ampuero A. Efecto de Temperatura y Tiempo de Almacenamiento de Ovarios de Alpacas sobre la Tasa de Maduración y División in vitro de Ovocitos Rivep 2014; 25: 477–486
- Banda J, Evangelista S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez C, Valdivia M, Santiani A. Efecto de dilutores en base a Tris, TES y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. Rev Inv Vet Perú 2010; 21 (2): 145 – 153.
- Bertoldo M, Holvoake PK, Evans G, Grupen CG. Oocyte developmental competence is reduced in sows during the seasonal infertility period. Reprod Fert Develop 2010; 22: 122-1229
- Catari, M. Influencia de diferentes medios de cultivo en el desarrollo de embriones procedentes de la fertilización y maduración in vitro de ovocitos de alpacas. Tesis pregrado. Puno, Peru Universidad Nacional del Altiplano-Puno, 2018.
- Casarini L, Riccetti L, De Pascali F, Nicoli A, Tagliavini S, Trenti T, et al. Follicle-stimulating hormone potentiates the steroidogenic activity of chorionic gonadotropin and the anti-apoptotic activity of luteinizing hormone in human granulosa-lutein cells in vitro. Mol Cell Endocrinol 2016; 422:103-114.
- Contreras M, Naveros M y Olaguivel C. Efecto del uso de dos técnicas de selección espermática en la producción in vitro de embriones de alpaca. SPERMOVA 2021; 11(1): 67-72.
- Condori R, Huanca W, Chileno M. et al. Effect of follicle-stimulating hormone addition on in vitro maturation and cleavage of alpaca (*Vicugna pacos*) Embryos. Reproduction, Fertility and Development 2010; 23: 224-224. <https://doi.org/10.1071/RDv23n1Ab252>
- Edwards RG. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. The Lancet. 1965; 2 (7419): 926-929
- Gamarra G, Huaman E, Leon S, Carpio M, Alvarado E, Asparrin M, Vivanco HW. First in vitro embryo production in alpacas (*Lama pacos*). Reproduction, Fertility and Development 2008; 21: 177-178. 367 (Abstract)
- Hafez ES, Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7th ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2002.
- Hansen A, Block D, Loureiro B, Bonilla L, Katherine A, Hendricks A. Effects of gamete source and culture conditions on the competence of in vitro-produced embryos for post-transfer survival in cattle. Reproduction, Fertility and Development 2010; 22: 59–66.
- Hinrichs K, Choi YH, Love LB, Varner D, Love CC, Walckenaer BE. Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: Changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. Biology of Reproduction 2005; 72(5): 1142–1150. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036012>
- Huanca F. Efecto de la aplicación del plasma seminal sobre la tasa, tiempo a la ovulación y desarrollo del cuerpo lúteo en alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis de Pregrado. Lima, Perú. Universidad Científica del Sur. 2014.
- Huanca W, Condori R, Cainzos J, Chileno M, Quintela L, Becerra J, Herradon G. Maturation in vitro and fertilization of alpaca (*Vicugna pacos*) oocytes: effect of time of incubation on nuclear maturation and cleavage. Reproduction, Fertility and Development. 2009; 22(1): 327-327 (Abstract)
- Huanca W, Condori P, Chileno M, García P, Cainzo J, Becerra J. Evaluación de Cuatro Tiempos de Cultivo sobre la Tasa de Maduración y División Post-Fecundación in vitro de Ovocitos de Alpaca. Rivep 2014; 25: 468–476
- Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, UK: CAB International; 1994.p. 626.
- Igarashi H, Takahashi T, Nagase S. Oocyte aging underlies female reproductive aging: biological mechanisms and therapeutic strategies. Reproductive Medicine and Biology 2015; 14: 159–169.
- Khatir H, Anouassi AH. 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.
- Maxwell WMC, Graaf SP, El-Hajj R, Evans G. 2007. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. Soc Reprod Fert Suppl 2007; 64:13–38. doi: 10.5661/RDR-VI-13
- Miao Y, Kikuchi K, Sun Q, Schatten H, Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility, Human Reproduction Update. 2009; 15: 573–585
- Mucci N, Aller JF, Kaiser GG, Hozbor F, AlberioR H. Producción in vitro de embriones bovinos: Suplementación de los medios de cultivo con suero. Archivos de Medicina Veterinaria 2006; 38(2): 97–104.
- Nedambale T, Dinnye's A, Groen W, Dobrinsky J, Tian X, Yang X. Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. Theriogenology 2004; 62: 437–449.
- O' Brien JK, Dwarte D, Ryan JP, Maxwell WMC, Evans G. Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. Reproduction, Fertility and Development 1996; 8(7):1029–1037.
- Ratto M, Berland M, Huanca W, Singh J, Adams GP. In vitro and in vivo maturation of llama oocytes. Theriogenology 2005; 63(9): 2445–2457.
- Ratto M, Huanca W, Singh J, Adams GP. Comparison of the effect of natural mating, LH , and GnRH on interval to ovulation and luteal function in llamas. Animal Reproduction Science 2006; 91:299–306.
- Ribeiro BI, Love LB, Choi YH, Hinrichs K. Transport of equine ovaries for assisted reproduction. Animal Reproduction Science, 2008; 108(1–2), 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.08.001>

- Ruiz J, Santayana R, Mendoza J, Landeo L, Huamán E, Ticllacur F, Mujica F, Silva L, Ratto MH. Effect of oocyte maturation time, sperm selection method and oxygen tension on in vitro embryo development in alpacas. *Theriogenology* 2017; 95: 127–132.
- Smith GD. In vitro maturation of oocytes. *Curr Womens Health R* 2001; 1(2):143-51.
- Thompson JJ, Peterson J. Bovine embryo culture in vitro: New developments and post-transfer consequences. *Hum. Reprod* 2000; 15:59-67.