

Comparación de sistemas de cultivo de embriones de alpacas Comparison alpaca embryos cultivation systems

Pérez Durand, Manuel Guido^{1*}; Zevallos Aragón Juan Pompeyo¹; Perez Guerra, Uri Harold²

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú. ²Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. *Autor para correspondencia guidpe@yahoo.es

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Artículo recibido 20-12-2016
Artículo aceptado 18-06-2017
On line: 26-06-2017

PALABRAS CLAVES:

Ovocitos,
cigoto,
cultivo,
embriones,
alpaca.

ARTICLE INFO

Article received 20-12-2016
Article accepted 18-06-2017
Online: 26-06-2017

KEY WORDS:

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 Puno-Perú. El objetivo principal fue evaluar el efecto del cultivo *in vitro* e *in vivo* de los cigotos de alpacas producidos *in vitro*. Se utilizaron 226 Complejos cumulus ovocitos (CCOs), que fueron obtenidos de los ovarios procedentes de alpacas beneficiadas en el camal. Los ovarios fueron transportados en solución salina al 0.9% y suplementada con antibióticos. Los CCOs fueron aspirados de folículos de 2 a 6 mm. Los ovocitos fueron madurados en 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 U.I./mL de gonadotropina coriónica equina, 10 U.I./mL de gonadotropina humana más 50 ug/mL de gentamicina y fueron cultivados a 38.5°C, bajo 5% de CO₂, y alta humedad por 36 h. La fertilización se realizó en FERT TALP (10 ovocitos/gota). Para el cultivo *in vitro* se utilizó el SOFaa. Para el cultivo *in vivo* se utilizó el oviducto de hembras. Los resultados fueron evaluados: A las 120 h de cultivo *in vitro* post inseminación 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 blástulas y 2 blástulas colapsadas. En conclusión, tanto el cultivo *in vitro* como *in vivo* de cigotos producidos *in vitro* pueden ser utilizados en la producción de embriones de alpacas.

ABSTRACT

The present study was carried out in a laboratory of Animal Reproduction of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of the National University of the Puno-Peru Highland. The main objective was to evaluate the effect of *in vitro* and *in vivo* culture of alpaca zygotes produced *in vitro*. We used 226 cumulus oocyte complexes (CCOs), which were obtained from the ovaries from animals that were beneficiated in the camal and transported in 0.9% saline and supplemented with antibiotics. CCOs were aspirated from follicles of 2 to 6 mm. The oocytes were matured in TCM 2520, supplemented with 2.2 mg/mL with sodium bicarbonate, 0.0028 mg/mL sodium pyruvate, 10% fetal serum, 2 IU/mL equine chorionic gonadotropin, 10 IU/mL chorionic gonadotropin Human plus 50 ug/mL gentamicin and were cultured at 38.5 ° C, under 5% CO₂, and high humidity for 36 h. Fertilization was performed in FERT TALP (10 oocytes/drop). For the *in vitro* culture SOFaa was used. *In vivo* culture was used oviduct of females. The results were: At 120 h of culture *in vitro* post insemination, 19 (17.4%) morulae and 8 (7.3%) blastocytes were observed and at 168 h, 18 (16.5%) morulae and 7 (6.4%) blastocytes were observed. From the *in vivo* culture in the oviduct of the receiving alpacas 3 blastocytes hatched, 5 blastulas and 2 collapsed blastulas were recovered. Conclusion The *in vitro* and *in vivo* culture of the zygotes produced *in vitro* is possible to be used for the production of alpaca embryos.

1) Tesista Facultad Ciencias Agrarias/Ingeniería Agronómica UNA-PUNO

INTRODUCCIÓN

Las alpacas y llamas habitan por encima de los 4 000 msnm y son criadas por pobladores de los andes del Perú, Estos animales les proveen de carne, fibra, estiércol, además del uso de las llamas como transporte (Novoa *et al.*, 1970; Fernandez-Baca *et al.*, 1970).

El desarrollo de las biotecnologías reproductivas en los camélidos sudamericanos, permitiría la propagación de los animales genéticamente superiores, especialmente los que poseen fibra fina y de colores naturales (Miragaya *et al.* 2006). Estudios realizados en producción de embriones *in vitro* con el objetivo de desarrollar protocolos en camélidos sudamericanos son pocos. En llamas (Del Campo *et al.*, 1994; Sansinena *et al.*, 2007; Conde *et al.*, 2008), alpacas (Ratto *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2013; Arriaga *et al.*, 2014; Huanca *et al.* 2014), reportan del 6 al 20% de producción de embriones en diferentes estadios. Mientras que en la especie bovina la producción de embriones *in vitro* es a nivel comercial, en forma de embriones frescos o congelados, oscilando las tasas de preñes entre 50 % y 40% respectivamente, favoreciendo una mayor eficiencia y el avance genético en esta especie (Sanches *et al.*, 2016).

El objetivo principal del presente estudio fue producir embriones *in vitro* a partir de ovocitos recuperados de ovarios de alpacas beneficiadas en el camal. El cultivo de los embriones se realizó por dos métodos: a) en placas dentro una incubadora convencional y b) los cigotos fueron transferidos al oviducto de hembras receptoras sincronizadas (ovulación y formación de cuerpo lúteo) para completar su desarrollo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Colección y maduración de los ovocitos

Los ovarios de las alpacas sacrificadas, fueron colectados del camal municipal de Nuñoa, ubicado en las coordenadas 14°28'48''S, 70°38'28''O, a 4023 msnm, Provincia de Melgar, Departamento de Puno.

Fueron transportados dentro las 6 h siguientes al Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano Puno-Perú. Los ovarios fueron acondicionados en bolsas pequeñas de polietileno con solución fisiológica (32 a 35°C), suplementado con 0.03 g/mL de Combipen (150 000 U.I. de penicilina G procainica, 150 000 U.I. de penicilina G sódica, 300 mg de sulfato de estreptomycin/mL, GENFAR S.A. Lima-Peru), estas bolsas con los ovarios se acondicionaron dentro de un dispositivo (Thermos) de agua caliente. En el laboratorio los ovarios fueron lavados dos veces con solución fisiológica suplementada con antibióticos. Los folículos (>de 2 mm), fueron aspirados con ayuda de una aguja de 20G adosado a jeringa de 5 mL. El líquido folicular obtenido fue depositado en un tubo Falcón de 15 mL y cerrado con su tapa, se dejó reposar por 20 min. Luego el sobrenadante fue eliminado con ayuda de una jeringa de tuberculina y el sedimento fue vertido a una placa Petri (10 x 35 mm), todos estos procesos se realizaron a una temperatura de 37°C. Los complejos cumulus-ovocitos (CCOs) fueron seleccionados con ayuda de un microscopio-estereoscopio invertido (Leica) a 40X. Los CCOs fueron clasificados de acuerdo al criterio recomendado por Leisinger *et al.* (2014). Los CCOs seleccionados fueron lavados 3 veces, en solución fosfatada (PBS) suplementado con 4 mg/mL de BSA (Sero Albumina Bovina), mas 50 ug/mL de gentamicina (GENFAR S.A. Lima-Peru). Cada 10 CCOs fueron lavados dos veces en el medio de maduración y luego transferidos a 60 uL de medio de maduración. El medio de maduración consistió 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 U.I./mL de gonadotropina corionica equina (eCG; Folligon, IntervetPty. Ltd., Netherlands), 10 U.I./mL de gonadotropina corionica humana (hCG; N.V. Organon O.S. Holland) más 50 ug/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.

3.2. Colección y preparación de los espermatozoides

Como donadores de espermatozoides se utilizaron machos con desviación de los conductos deferentes (Pérez *y col.*, 2006). Para la colección de los espermatozoides los machos dadores fueron colocados sobre una mesa en posición decúbito lateral, siendo sujetados los miembros posteriores por dos auxiliares. La colección se realizo de acuerdo a lo descrito por Pérez *y col.*(2006), con la variación de 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 ug/mL de gentamicina; Parrish *et al.* 1988). La suspensión de los espermatozoides por el método de swim up se llevo a cabo dentro la incubadora por 1 h a 38.5oC, con 5% de CO² y alta humedad. Del sobrenadante se aspiró 700 uL y se centrifugo a 350 x g por 10 min, desechando el sobrenadante. El pellet formado por los espermatozoides fue re suspendido con 100 uL 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, 0.25 mM de piruvato de sodio, 6 mg/mL de BSA libre de ácidos grasos y 50 ug/mL de gentamicina; Parrish *et al.*, 1988), la concentración de los espermatozoides fue ajustada a 5 x 10⁶ de espermatozoides/mL (Conde *et al.*, 2008), tomando en cuenta la motilidad total de los espermatozoides.

3.3. Fertilización in vitro

Las células del cumulus de los ovocitos madurados, fueron removidos por vortericación a 4000 rpm por 3 min, en 0.5 mL de PBS + 0.4 mg/mL de BSA, dentro un tubo de ensayo de 7 mL de capacidad. En los ovocitos desnudados se evaluó la maduración ovocitaria por presencia del corpúsculo polar bajo un microscopio estereoscopio invertido a 100X y 200X. Los ovocitos desnudados fueron lavados 2 veces en el medio FERT TALP (Parrish *et al.* 1988), luego

transferidos a una gota de 44 uL de FERT TALP (10 ovocitos), dentro de placas Petri de 35 mm x 10 mm, cubiertos con aceite mineral. 10 min antes de la inseminación se suplementaron a la gota de fertilización 2 uL de la mezcla (500 uM de penicillamine, 250 uM de hipotaurina, 500 uM de epinefrina (Leibfried and Bavister 1982), 10 ug/mL de heparina (Conde *et al.* 2008) y 2 uL de la concentración de espermatozoides. Se incubaron por 24 h a 38.5oC en una atmósfera húmeda con 5% de CO².

3.4. Cultivo de los cigotos

Los presuntos cigotos fueron vortericados a 4000 rpm por 4 s para retirar el resto de los espermatozoides. Los cigotos se colocaron por 7 días más en medio de cultivo (10 a 15 cigotos en 50 uL 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 ug/mL de gentamicina mas 5% de suero fetal en los 4 primeros días de cultivo y el 1% en los 3 días siguientes. La incubación se realizó a 38.5oC en una atmósfera húmeda con 5% de CO². El cambio de medio se realizó cada 48 h.

3.5. Evaluación del desarrollo embrionario in vitro

La división celular y el desarrollo embrionario se registraron en imágenes a las 48, 120 y 168 h post fertilización, con ayuda de un microscopio estereoscopio invertido a 100X y 200X y su aplicación (Leica application Suite Version 2.0.0, 2010).

3.6. Cultivo de cigotos en el oviducto de alpaca

A las alpacas receptoras (n=3), se les monitoreo la presencia del folículo pre-ovulatorio > 7mm, usando un ultra sonógrafo con transductor lineal a 7.5 MHz (Chison 550). Se indujo la ovulación con la aplicación (IM) de 8 ug de GnRH, a las 24 h se evaluó la ovulación por ultrasonografía. Los cigotos producto de la maduración y fertilización *in vitro* se colocaron en el oviducto de las alpacas 60 h (después de la fertilización) pos aplicación de GnRH. Para

exteriorizar el oviducto de las alpacas se realizó la cirugía (laparotomía), se anestesió a la hembra administrando vía intravenosa 0.4 mg/kg de xilacina (Clorhidrato de Xilacina, 5mg/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 la incisión de 10 cm realizada en la línea alba a 4cm de la glándula mamaria, con ayuda de los dedos se exteriorizó el ovario. Se fijó entre los dedos el infundíbulo y a 2 cm del ovario, en dirección al útero se punzó el oviducto con una aguja 18G, para aperturar la pared del oviducto. Con ayuda del capilar de vidrio de un micro dispensador (Drummond Scientific Company) calibrado para 5 µL los cigotos se cargaron en PBS + 10% de suero fetal y se introdujeron a una profundidad de 3.5 cm dentro del oviducto.

3.7. Recuperación de los embriones del oviducto de las receptoras

Las alpacas receptoras fueron puestas en ayuno por 24 h antes del día de la recuperación de los embriones y se procedió de la siguiente manera: a) 20 min antes de la recuperación se tranquilizaron aplicando 1 mg de maleato de acepromazina/Kg de peso vivo, b) Las receptoras fueron inmovilizadas sobre una mesa, pasando una 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 higienizó con abundante agua y jabón la región perianal, se secó con papel toalla y se desinfectó con alcohol, e) Se aplicó una anestesia epidural aplicando 1.5 mL de lidocaína clorhidrato al 2%, f) Con la ayuda de la guía para inseminación artificial se introdujo la sonda Foley Nro 16 Fr/Ch de dos vías para atravesar la cervix y dirigirla hacia el cuerno cuyo ovario tenía el cuerpo lúteo, g) Ubicado el cuerno se ancló la sonda inflando el balón con 7 a 10 mL de aire, luego se retiró la guía, h) El medio de lavado PBS+1% de suero fetal se introdujo con ayuda de un tubo de plástico en forma "Y" conectado al frasco que contenía el medio y por gravedad se llenó la solución de lavado, hasta sentir la turgencia del

cuerno uterino, momento en que se cerró el clip y luego se dejó salir el medio de lavado hacia el filtro colector, abriendo el respectivo clip, con la ayuda de suaves masajes del cuerno, i) Este procedimiento se repitió por tres a 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 Petri, se realizó la búsqueda de los embriones y posterior clasificación bajo el microscopio estereoscópico a 40X.

RESULTADOS

Para la producción de embriones de camélidos, se emplearon un total de 226 ovocitos de grado 1 y 2, recuperados de ovarios. Durante el cultivo se perdieron 5 embriones. Los resultados de producción de embriones directamente se evaluaron a partir de la división, 48 h pos inseminación y se muestran en la Tabla 1 y Fig. 1. El número de embriones asignados para el cultivo *in vitro* e *in vivo* fueron 30 y 32 cigotos respectivamente, para cada tratamiento. Durante la evaluación a las 48 h pos inseminación se observaron 11 ovocitos con la presencia del primer corpúsculo que no fertilizaron. También se observaron al momento de fertilizar 2 embriones en división con 2 células por efecto de la partenogénesis.

Tabla 1. Proporción de embriones con diferentes estadios cultivados *in vitro* e *in vivo*

	TOTAL DE OVOCITOS	48 horas		120 horas		168 horas	
		DIVISIÓN	MÓRULA	BLASTOCITO	MÓRULA	BLASTOCITO	
Cultivo <i>in vitro</i>	109	30 (27.5%)	19 (17.4%)	8 (7.3%)	18 (16.5%)	7 (6.4%)	
Cultivo <i>in vivo</i>	117	32 (27.3%)	3 Be (2.5%), 5Bl (4.3%), 2Bc (1.7%)		

Be= Blastocito eclosionado, Bl= Blastula, Bc= Blastocito colapsado.

En la evaluación a las 120 h pos inseminación de los embriones del cultivo *in vitro* se observaron diferentes estadios: mórulas 19(17.4%) y blastocitos 8 (7.3%). Entre las cuales 16 fueron mórulas compactas y 3 embriones con 4 a 8 células con blastómeros de desarrollo desigual. 7 blastocitos estuvieron en el estado inicial y 1 blastocito expandido.

A la evaluación a la 168 h pos inseminación de los embriones en el cultivo *in vitro* se perdieron 2 embriones y se observaron 18 (16.5%) mórulas y 7 (6.4%) blastocitos. Donde 4 mórulas se mantenían como compactas, 3 embriones estuvieron detenidos con 4 a 8 células y en proceso de degeneración, 11 mórulas en proceso de degeneración y deformación. En los 7 blastocitos se observaron inicios de degeneración y deformación tornándose de color negro.

Los 32 cigotos que fueron asignadas para el cultivo *in vivo* se transfirieron a oviductos de 3 alpacas receptoras (10, 11, 11 cigotos). El lavado se realizó a los 5 días posteriores del cultivo en el oviducto de las alpacas receptoras. De los 32 cigotos transferidos a los oviductos de las receptoras se recuperaron 10 embriones, que hacen el 31.2% de tasa de recuperación, observándose los siguientes diferentes estadios: 3 blastocitos eclosionados, 5 blástulas y 2 blástulas colapsadas.

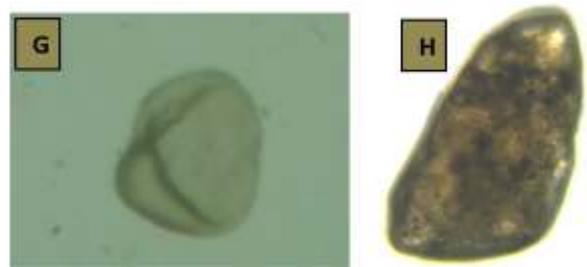
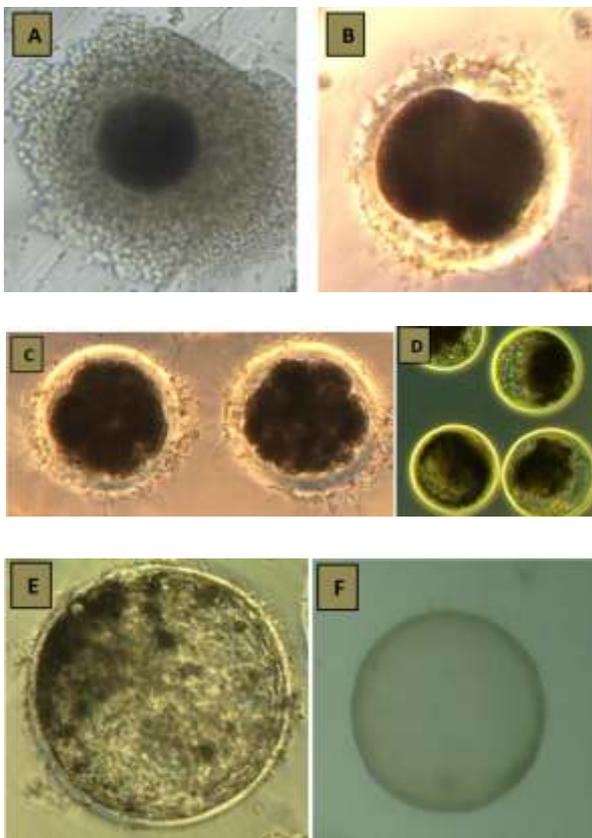


Fig. 1. A) Ovocito categoría 1, B) Cigoto en división, C) Morula compacta D) Blastocisto inicial, E) Blastocisto expandido, F) Blastocisto eclosionado, G) Blastula, H) Blastocisto colapsado (200X).

DISCUSIÓN

La producción de embriones *in vitro*, en el presente estudio fue el 22.9% de embriones a las 168 h post inseminación en diferentes estadios y categorías. Contrastando con previos estudios, realizados en llamas (Del Campo *et al.*, 1994) obtuvieron 15.85% embriones con 2 a 16 células mientras que en alpacas aplicando diferentes tiempos de maduración (Huanca *et al.*, 2014) lograron el 19.8% de porcentaje de división a las 72 h post maduración.

.Conservando los ovarios a diferentes temperaturas y con 16 h de conservación, Arriaga *et al.*, (2014) reportaron el 27.3% de embriones divididos a la 72 h post maduración. La amplia variación de resultados reportados se podría deberse a las diferentes condiciones que han sido utilizadas por los diferentes autores para el proceso de la producción de embriones *in vitro* en camélidos. A pesar de estos resultados en la producción de embriones *in vitro* en camélidos sudamericanos faltarían. Es necesario realizar estudios para implementar los protocolos para esta especie y lograr los porcentajes elevados como los obtenidos en vacunos que llegan alrededor del 70% de división de los embriones, después de 44 a 48 h post fertilización con producción de embriones en estado de blastocito del 32% (Coleman *et al.*, 2007). La presencia de embriones por partenogénesis en camélidos se manifiestan en un 3% (Del campo *et al.*, 1994), lo que se ratifica en el presente trabajo.

En el presente estudio, a las 120 h de cultivo pos inseminación *in vitro* la proporción de embriones que se logró fue: 19 (17.4%) mórulas compactas y 8 (7.3%) de blastocitos tempranos. En la cronología del desarrollo embrionaria y la migración al útero, los embriones a los 5 días post ovulación, Picha *et al.* (2013), reportaron que el 100% de los embriones están en estado de mórula y todavía permanecen en el oviducto. Existiendo una diferencia en el estadio de embriones a las 120 h (5 días) con el presente estudio, en donde se constató la presencia de blastocitos tempranos, esta variación podría atribuirse 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 fertilización *in vitro*, pero si reportan a partir de los 7 días post inseminación.

En el presente estudio a las 168 h post inseminación se lograron 18 (16.5%) mórulas, 7(6.4%) blastocitos. En todos los embriones se notó el inicio del proceso de degeneración y deformación. En llamas Del campo *et al.* (1994) reportaron el 5.6% de mórulas y 6.0% de blastocitos tempranos 7 días post inseminación y en el cultivo con la presencia con células oviductales de llama, en alpacas se han logrado el 21.1% de blastocitos de ovarios que se sometieron 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 en los estudios previos y contrastados con los resultados del presente estudio son similares.

La presencia de embriones con procesos de degeneración y deformación a partir del 7 día de cultivo, se debe probablemente al protocolo aplicado, insumos u otros factores que no se pueden controlar en la altura (3870 msnm).

Después que los embriones fueron cultivados en el oviducto de las hembras receptoras por espacio de 5 días se recuperaron 10 embriones de 32 cigotos que se colocaron. Los estadios de los embriones

recuperados, fueron 3 en blastocitos eclosionados, 5 en estado de blástula y 2 en estado de blástulas colapsadas. Reportes de este tipo de cultivo de embriones no existen en camélidos siendo este estudio el primero que se presenta. Estudios en hembras con monta natural, sobre la cronología de desarrollo embrionario y migración uterina, indican que a los 8 días post ovulación están en estado de blastocito eclosionado y a los 9 días comienzan a alargarse (Picha *et al.*, 2013) lo que nos permite inferir que los resultados de presente estudio coinciden en el desarrollo de los embriones, asumiendo que las 120 h es igual a 5 días, aquí se le suma 48 h post maduración que hacen 2 días y finalmente se le suma 24 h que corresponden a un día de fertilización. Realizando la sumatoria de los días correspondientes hacen (2+1+5) hacen los 8 días, donde los embriones están en estado de blastocito eclosionado. Pero en el presente estudio se recuperaron 2 embriones en estado de blástulas colapsadas, debido probablemente a la ruptura que se produjo en el momento de la colección por presiones externas, lo cual fue provocado por el sistema de colección que se usó en la técnica de recuperación.

El estado cronológico y morfológico de los embriones recuperados de las receptoras indica que el efecto del medio ambiente del oviducto actuó positivamente en su desarrollo. Así diversos estudios refieren que el embrión permanece después de la fertilización 3.5 a 4 días en el oviducto, durante este tiempo el embrión desarrolla y es mantenido por el fluido del oviducto, 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; Neimann and Wrenzycki, 2000). Lo que no sucedió con los embriones producidos *in vitro*.

CONCLUSIONES

Al cultivo *in vitro* se observaron diferentes estadios embrionarios (mórulas, blastocitos), en donde algunas de las cuales entraron en proceso de degeneración y deformación al final del cultivo. Los cigotos cultivados en el oviducto de hembras receptoras fueron más uniformes como blastocitos eclosionados y blástulas.

Es necesario seguir estudiando medios específicos para la producción de embriones *in vitro* en camélidos sudamericanos.

Agradecimiento

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

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arriaga IC, Huanca W, Terreros M, Becerra JJ, García PH, Ampuero A. 2014. Efecto de Temperatura y Tiempo de Almacenamiento de Ovarios de Alpacas sobre la Tasa de Maduración y División *in vitro* de Ovocitos. *RevInvVet Perú* 25(4), 477-486.
- Coleman NV, Shagiakhmetova GA, Lebedeva IY, Kuzmina TI, Golubev AK. 2007. In vitro maturation and early developmental capacity of bovine oocytes cultured in pure follicular fluid and supplementation with follicular wall. *Theriogenology* 67, 1053–1059.
- Conde PA, Herrera C, Trasorras VL, Giuliano S, Director A, Miragaya MH, Chaves MG, Sarchi MI, Stivale D, Quintans C, Agüero A, RutterB, Pasqualini S. 2008. In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Anim. Reprod. Sci.* 109, 298–308.
- Del Campo MR, Del Campo CH, Donoso X, Berland M, Mapletoft R. 1994. *in vitro* fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductalcell co-culture. *Theriogenology* 41, 1219–1229.
- Fernandez-Baca S, Hansel W, Novoa C. 1970. Embryonic mortality in the alpaca. *Biol Reprod* 3, 243-251.
- Huanca W, Condori R, Chileno M, Garcia P, Cainzo J, Becerra JJ. 2014. Evaluación de cuatro tiempos de cultivo sobre la tasa de maduración y división pos fecundación *in vitro* de ovocitos de alpaca. *Rev Inv Vet Peru* 25(4), 468-476.
- Leibfried ML, Bavister BD. 1982. Effects of epinephrine and hypotaurine on in-vitro fertilization in the golden hamster. *J ReprodFertil* 66, 87-93.
- Leisinger CA, Coffman EA, Coutinho da Silva MA, Forshey BS, Pinto CRF. 2014. Factors affecting in vitro maturation of alpaca (*Lama paco*) oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 150, 70-75.
- Memeili E, First NL. 2000. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 8, 87-97.
- Miragaya MH, Chaves MG, Agüero A. 2006. Reproductive Biotchnology in south American camelids. *Small Ruminant Research* 61, 299-310.
- Niemann H, Wrenzycki C. 2000. Alterations of expression of developmentally important genes in pre-implantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 53, 21-34.
- Novoa C. 1970. Reproduction in camelidae (Review). *J Reprod Fertil* 22, 3-20.
- Parrish JJ, Susko-Prurish J, Winer MA, First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod*, 38, 1171-1180.
- Pérez MG, Apaza E, Deza H. 2006. Congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de camélidos. *Allpaqa, Revista de Investigación del IIPC* Vol. 11 Nro 01. pp 17-23, Puno-Perú.

Picha Y, Tibary A, Memon M, Kasimanickam R,
Sumar J. 2013. Chronology of early embryonic