

## EVALUATION OF TWO CULTURE MEDIA IN IN VITRO PRODUCTION OF ALPACA (Vicugna pacos) EMBRYOS

### Evaluación de dos medios de cultivo en la producción de embriones in vitro de alpacas (Vicugna pacos)

Irving Mitchell Laines-Arcce<sup>1\*</sup>, Mijaíl Contreras<sup>1</sup>, Cesar A. Olaguivel<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Laboratorio de fisiología animal, Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, Perú

\* Corresponding author:  
Irving Mitchell Laines Arcce  
E-mail:  
[irvingmit.lai@gmail.com](mailto:irvingmit.lai@gmail.com)

Recibido: 11/06/2021

Aceptado: 25/07/2021

Publicado: 13/08/2021

#### ABSTRACT

The present study aims to evaluate the effect of two culture media on the production of in vitro embryos in alpacas (*Vicugna pacos*). The ovaries were transported at 10.52° C in 0.9% saline solution supplemented with gentamicin. The ovaries were transported at 10.52° C in 0.9% physiological saline solution supplemented with gentamicin. 492 ovaries were used throughout the experiment. 2142 oocytes of quality I, II and III were recovered. The oocytes were matured in vitro for 32 h and were subsequently fertilized (incubated for 18 h) with sperm obtained from the tail of the epididymis and selected with a 45/90 percoll gradient. Then, the presumed zygotes were denuded from the cumulus cells, to later be cultured in two culture media: synthetic oviductal fluid medium (SOFaa) and simple optimized potassium medium (KSOMaa) and incubated at 38.5 ° C, 5 % CO<sub>2</sub>, 5%, O<sub>2</sub>, and 90% relative humidity for 7 days. Morula and blastocyst rate evaluation was performed at the end of embryo culture. The morula rate at 7 days was 41.49 ± 10.52 and 41.51 ± 6.50% for KSOMaa and SOFaa, respectively (P <0.05). The blastocyst rate for the two culture media KSOMaa and SOFaa, was 14.08 ± 5.17 and 11.73 ± 5.69 %, respectively, and there were no statistical differences (P>0.05). The embryonic quality in KSOMaa and SOFaa media did not show statistical differences. In conclusion, the KSOMaa and SOFaa culture medium can be used in the production of in vitro embryos of alpacas.

**Keywords:** Alpacas, culture media, embryonic development, embryos.

#### RESUMEN

El presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de dos medios de cultivo en la producción de embriones in vitro en alpacas (*Vicugna pacos*). Los ovarios fueron transportados a 10.52°C en solución salina fisiológica al 0.9% suplementado con gentamicina. Se utilizó 492 ovarios en todo el experimento. Se logró recuperar 2142 ovocitos de calidad I, II y III. Los ovocitos fueron madurados in vitro por 32 h y posteriormente fueron fecundados (incubados por 18h) con espermatozoides obtenidas de la cola de epidídimo y seleccionados con gradiente de percoll de 45/90. Luego, los presuntos cigotos fueron denudados de las células del cumulus, para luego ser cultivadas en dos medios de cultivo: medio de fluido oviductal sintético (SOFaa) y medio optimizado simple de potasio (KSOMaa) e incubados a 38,5 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 5%, O<sub>2</sub>, y 90% de humedad relativa durante 7 días. La evaluación de la tasa de morulas y blastocistos se realizó al finalizar el cultivo de embriones. La tasa de mórulas a los 7 días fue 41.49±10.52 y 41.51±6.50% para KSOMaa y SOFaa, respectivamente (P<0.05) La tasa de blastocistos para los dos medios de cultivo KSOMaa y SOFaa, fue 14.08±5.17 y 11.73±5.69%, respectivamente y no existió diferencias estadísticas (P>0.05). La calidad embrionaria en medios KSOMaa y SOFaa, no mostro diferencias estadísticas. En conclusión, el medio de cultivo KSOMaa y SOFaa pueden ser utilizados en la producción de embriones in vitro de alpacas.

**Palabras claves:** Alpacas, medios de cultivo, desarrollo embrionario, embriones

## INTRODUCCION

La crianza de los camélidos sudamericanos como las alpacas y llamas es una de las principales actividades de gran importancia e impacto en el desarrollo socio económico de la población altoandina en el Perú. Todo esto se debe a su gran capacidad de adaptación a las condiciones medioambientales, como altitud que sobrepasan los 4,000 metros m.s.n.m., además de utilizarse como una fuente alimenticia proteica de origen animal y medio de transporte y, en el caso de la alpaca, como un recurso para la producción de fibra de excelente calidad (Huanca & Adams, 2006).

En los últimos años podemos observar un aumento en la aplicación de diferentes tecnologías reproductivas en el área de camélidos sudamericanos (Miragaya et al., 2006). La comprensión de la fisiología de los camélidos ha contribuido al desarrollo y aplicación de las biotecnologías reproductivas. A pesar de que se realiza en forma limitada, la inseminación artificial con semen fresco es la técnica más utilizada (Huanca & Adams, 2006).

Por otro lado, el desarrollo de protocolos de estimulación ovárica y transferencia de embriones, así como la sincronización y estimulación de la onda folicular (Ratto et al., 2003; Huanca et al., 2009) es mayor con respecto a la maduración y fecundación in vitro (Del Campo et al., 1994; Miragaya et al., 2006; Conde et al., 2008). Esta última, podría reducir el tiempo entre generaciones y de esta manera, podría aplicarse en programas de mejoramiento genético, permitiendo así la transmisión de características deseables en los animales, en especial los que presentan una fibra muy fina y colores naturales (Miragaya et al., 2006; Conde et al., 2008).

El éxito de un protocolo de producción de embriones in vitro requiere un control preciso de los procesos de maduración, fecundación y cultivo de los gametos y embriones. Uno de los factores clave es el tiempo y temperatura de transporte de los ovarios, de modo de asegurar la viabilidad y capacidad meiótica y citoplasmática de los ovocitos y posterior desarrollo embrionario (Huanca et al., 2007). Teniendo en cuenta la escasa información existente en camelidos sobre la estandarización de protocolos para la producción de embriones in vitro, es importante, estudiar y evaluar factores involucrados con el cultivo de los presuntos cigotos, con la finalidad de obtener una mayor tasa de embriones producidos de buena calidad (Huanca et al., 2014). La formulación de medios de cultivo es uno de los factores esenciales y que requieren su evaluación en cada especie y evitar componentes innecesarios o incluso perjudiciales para los cigotos en desarrollo (Feugang et al., 2009).

Los cigotos son sometidos a cultivo in vitro en medios suplementados con fuentes que le proporcionen energía, aminoácidos y factores de crecimiento con el fin de asegurar su sobrevivencia y desarrollo embrionario (Gonella et al., 2013). Existen protocolos donde se añade cisteamina al medio de cultivo, mejorando considerablemente la tasa de desarrollo embrionario in vitro hasta el estadio de blastocisto (Quintanilla et al., 2015). El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de dos medios de cultivo modificados en la producción de embriones in vitro en alpacas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Lugar de estudio*

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán del 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 de muestras*

Los ovarios se recolectaron en el matadero municipal de Huancavelica de alpacas mayores a 2 años, situado a una altitud de 3680 m.s.n.m. Para el transporte, los ovarios fueron colocados en solución salina fisiológica 0,9% suplementada con gentamicina (80ug/ml) y asilada en una caja isotérmica que contenía gel refrigerante. La duración de transporte fue de 19 horas, siendo la temperatura de arribo al laboratorio de 10.52 °C. Una vez en el laboratorio, se realizó el lavado tres veces con solución salina fisiológica al 0.9% más antibiótico a 37°C para eliminar la sangre y remover exceso de tejido de grasa y ligamento ancho.

### *Recuperación, selección y maduración in vitro de ovocitos*

La recuperación de los complejos ovocito-cúmulos (COCs) se realizó utilizando la técnica Slicing que consistió en realizar cortes a nivel de la superficie de los folículos de 2-6 mm, en una placa de Petri de 90 mm utilizando hoja de bisturí N° 21, siguiendo las recomendaciones de Gómez et al. (2013).

La selección de COCs se realizó con la ayuda de un estereoscopio (Motic, modelo: SMZ-168) con platina térmica (38 °C) incorporado (Neovet, TIC-17RGTi). La clasificación de la calidad de los ovocitos se realizó utilizando la escala del I al IV considerando los criterios de compactación del cúmulo y aspecto citoplasmático (Ratto et al., 2005; De Loos et al., 1989).

Los COCs de categoría I, II y III, fueron madurados en incubadora (Bionex, VS-9160GC) a 38,5 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y 90 % de humedad por 32 h en medio de maduración suplementado con TCM-199 (M-4530, Sigma), 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 (80 mg/ml) y suplementado con factores de crecimiento (Palomino et al., 2020).

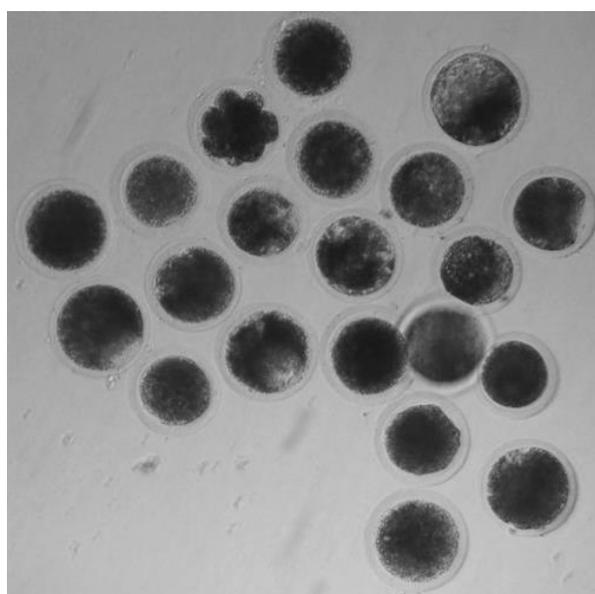
### *Fecundación in vitro de ovocitos (FIV)*

Los testículos se recolectaron en el matadero fueron transportadas cubiertas en papel toalla en una caja isotérmica con gel refrigerante por un tiempo de 20h. Una vez en el laboratorio, se procedió a limpiarlos y secarlos con papel toalla, luego se cortó la túnica albugínea liberando el testículo y epidídimo.

Se preparó el dilutor AndroMed® con agua milli-Q en proporción de 1:4 atemperado en Baño maría (Kossodo, YCW-010E) a 37 °C. Luego, se procedió a realizar cortes transversales en la cola del epidídimo para la recuperación de los espermatozoides en placas Petri de 60 mm con dilutor, se dejó a temperatura de ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se realizó la determinación de la concentración y viabilidad espermática. Las muestras se congelaron en

crioviales en volumen de 500  $\mu$ L de semen diluido en AndroMed, siguiendo el protocolo de Santayana (2011).

Los espermatozoides fueron descongelados en baño maría a 37°C en baño maría. 100  $\mu$ L de porción espermática se añadió en la superficie de la columna de percoll® 45/90, preparada en criovial de 1.5 mL. La muestra se centrifugó a 504 x g durante 15 minutos, transcurrido el tiempo se eliminó el sobrenadante quedando solo el pellet e inmediatamente se adicionó 100  $\mu$ L de medio de capacitación y se volvió a centrifugar a 504 x g durante 10 minutos, finalizada la última centrifugación se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 20  $\mu$ L de medio FIV para su dilución. La dilución final para su uso en fecundación in vitro fue 1 a 2x10<sup>6</sup>/ml, siguiendo las recomendaciones de Huanca et al. (2014).



**Figura 1.** Ovocitos y embriones de alpaca producidos in vitro, día 7 post fecundación.

Después de 32h de maduración in vitro, los ovocitos fueron lavados y colocados en medio de fecundación previamente acondicionado en incubadora (Bionex, VS-9160GC) por 2h a 38,5 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y 90 % de humedad. Se utilizó 4 a 6  $\mu$ L de porción espermática en cada pocillo (4 well) de FIV. 18 h de la fecundación in vitro, los presuntos cigotos fueron desnudados por pipeteo. Posteriormente, los ovocitos fueron distribuido aleatoriamente en dos grupos: medio SOFaa y medio KSOMaa. Donde el medio SOFaa está constituido por: 100 mM NaCl; 7 mM KCl; 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,71 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0.49 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 25,07 mM NaHCO<sub>3</sub>; 1 mg/100ml rojo fenol; 21,9 mM lactato de sodio (60%); 0,4 mM piruvato de sodio; 0.039 mg/ml glutamina; 100x aminoácidos esenciales; 50x aminoácidos no esenciales; 0.1mg/ml Ácido cítrico, 0.5 mg/ml; myoinositol 5% SFB 3 mg/ml BSA; 50 ug/ml gentamicina, y medio KSOMaa: 95 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 0,35 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,71 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 25,07 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,20 mM S04Mg.7H20; 1 mg/100ml rojo fenol; 21,9 mM lactato de sodio (60%); 0,6 mM piruvato de sodio; 1,46 mg/ml Glutamina; 100x aminoácidos esenciales; 50x aminoácidos no esenciales; 3 mg/ml BSA, 0,2 mM Glucosa; 3 mg/ml EDTA; 50 ug/ml gentamicina, siendo la diferencia

entre uno y otro medio la adición de suero fetal bovino, ácido cítrico y EDTA (Fischer-Brown et al., 2005). Las plas de cultivo in vitro colocadas en bolsas de propileno estéril con mezcla de gases 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 90% de N<sub>2</sub>, durante 7 días a una temperatura 38,5 °C.

La evaluación del desarrollo embrionario se realizó con la ayuda de un estereoscopio a 20X, después de 7 días post fecundación in vitro según los criterios de la Sociedad internacional de tecnología embrionaria IETS (Bó y Mapletoft, 2018); estadio de desarrollo: Mórula temprana (MT), mórula compacta (MC), blastocisto temprano (BT), blastocisto expandido (BE), blastocisto protruido (BP) y calidad embrionaria: Excelente (I), bueno (II), regular (III) y malo (IV).

#### **Análisis estadístico**

Se realizó análisis de normalidad (test Shapiro-wilk) y homogeneidad de varianza (prueba de Bartlett). Se realizó análisis de varianza para determinar la diferencia de la producción embrionaria entre los medios, a nivel de confianza es de un 95%. Los datos que no cumplen con los criterios de normalidad y homogeneidad, se realizó una transformación de datos por el método de Box-Cox para que pueda cumplir los supuestos. El análisis estático se ejecutó en software el programa estadístico R 3.4.3.

## **RESULTADOS**

#### **Recuperación de COCs**

De 492 ovarios se recuperaron un total de 2142 ovocitos entre las calidades I, II y III, haciendo un promedio de recuperación de 4.55  $\pm$  1.25 ovocitos/ovario con un mínimo de 3 y máximo de 9 ovocitos.

#### **Tasa de producción de embriones (%)**

El porcentaje total de embriones (morulas + blastocistos) obtenidos a los 7 días post cultivo fue 55.96 $\pm$ 13.63 y 53.86 $\pm$ 9.16% para los medios KSOMaa y SOFaa, respectivamente, no habiendo diferencia estadística significativa entre los medios utilizados (p $\leq$ 0.05) (ver Tabla 1).

**Tabla 1.** Efecto de los medios de cultivo KSOMaa y SOFaa sobre la tasa de producción in vitro de embriones de alpacas (Vicugna pacos) al día 7 post de fecundación in vitro.

	SOFaa		KSOMaa	
	n	Media $\pm$ DS	n	Media $\pm$ DS
Ovocitos	932		931	
Mórulas(D7)	391	41.95 $\pm$ 6.50 <sup>a</sup>	387	41.57 $\pm$ 10.52 <sup>a</sup>
Blastocistos (D7)	111	11.91 $\pm$ 5.69 <sup>a</sup>	134	14.39 $\pm$ 5.17 <sup>a</sup>
Morulas + Blastocistos (Día 7)	502	53.86 $\pm$ 9.16 <sup>a</sup>	521	55.96 $\pm$ 13.63 <sup>a</sup>

<sup>a,a</sup> letras iguales en la misma fila denotan que no existe diferencia estadística significativa (p $\leq$ 0.05)

#### **Calidad de embriones in vitro**

Se muestran el promedio de producción de embriones in vitro según su calidad (Tabla 2). Estas cuatro categorías de calidad se establecieron de acuerdo con las normas de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones. Para el medio SOFaa y KSOMaa se obtuvo en calidad Excelente  $16.20 \pm 8.49\%$  y  $18.80 \pm 12.25\%$  respectivamente, de calidad Bueno  $25.00 \pm 5.87\%$  y  $25.89 \pm 6.96\%$ , de calidad Regular  $12.66 \pm 6.82\%$  y  $11.28 \pm 6.35\%$  y de calidad Malo o degenerado  $46.76 \pm 9.16\%$  y  $44.45 \pm 13.63\%$  respectivamente. No habiendo diferencias estadísticas significativas entre las mismas calidades de uno u otro medio.

**Tabla 2.** Efecto de los medios de cultivo KSOMaa y SOFaa sobre la calidad de embriones (mórulas + blastocistos) de alpacas (*Vicugna pacos*) producidos in vitro, 7 días post fecundación in vitro.

	SOFaa		KSOMaa	
	n	media $\pm$ DS	n	media $\pm$ DS
Excelente	151	$16.20 \pm 8.49^a$	175	$18.80 \pm 12.25^a$
Bueno	233	$25.00 \pm 5.87^a$	241	$25.89 \pm 6.96^a$
Regular	118	$12.66 \pm 6.82^a$	105	$11.28 \pm 6.35^a$
TOTAL	502		521	

<sup>a,a</sup> letras iguales en la misma fila denotan que no existe diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ )

## DISCUSIÓN

Existen varios factores que pueden influir en la tasa de producción de embriones in vitro, siendo uno de ellos el transporte de ovarios. Periodos de transporte de ovarios de 16h, fueron evaluados en alpacas por Arriaga et al. (2014), reportando una tasa de blastocistos de 14.2%, siendo estos valores similares a los obtenidos en este estudio.

En bovinos, un transporte de ovarios a 10 °C por 24 horas no afectó la tasa de blastocistos (25%) y no fue diferente estadísticamente al grupo control (27%) (Matsushita et al., 2004). Asimismo, Wang et al. (2011) concluyeron que el almacenamiento a 15 °C por un periodo de 3 a 4 h tenía un efecto benéfico significativo en la calidad y competencia de desarrollo de ovocitos usados para la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT). Aunque, la susceptibilidad de los ovocitos a bajas temperaturas se debe a los cambios de las membranas lipídicas, cuando se exponen a temperaturas inferiores a 20°C (Arav et al., 1996); así como lesiones del huso meiótico y endurecimiento de la zona pelúcida que afectaba directamente la fecundación (Włodarczyk et al., 2009).

Hoy en día obtener embriones (blastocistos) de excelente calidad in vitro, continúa siendo un desafío y muchas veces la composición de los medios de cultivo es un factor determinante sobre calidad final de los embriones. En este estudio, la tasa de blastocistos fue 11.91 y 14.39%, para los medios de cultivo SOFaa y KSOMaa, respectivamente. Similares resultados, fueron reportados por Landeo et al. (2017) con 23.6% y 19.9% de blastocistos, en medio de cultivo SOF y KSOM, respectivamente y por Catari, (2018) con 14.9%, 10.5% de blastocistos en medio de cultivo SOFaa, KSOMaa. Las variaciones en la producción de embriones pueden ocurrir con el nivel de suplementación con suero fetal que aporta factores de crecimiento, hormonas, minerales y lípidos, que, al ser usados en concentraciones apropiadas en el medio de cultivo,

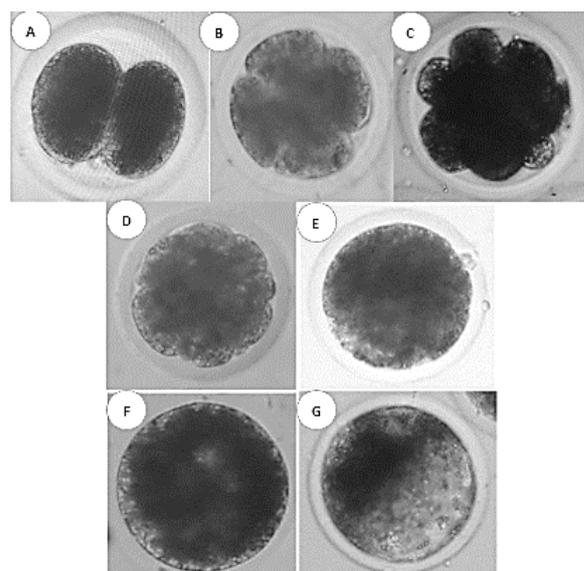
suplen satisfactoriamente los requerimientos metabólicos que garantizan los procesos de división meiótica durante la maduración y desarrollo embrionario.

En bovinos, al comparar los medios de cultivo KSOMaa y SOFaa en el cultivo de embriones, se reportó 13,06, 19,63% de blastocistos al día 7 post cultivo, respectivamente (Pahuara, 2015). Tasa de blastocisto (15%) similares obtuvo Mejía et al. (2009) con medio de cultivo comercial a base de KSOMaa

Uno de los insumos clave en la preparación de medios de cultivo óptimos es el uso de agua ultrapura e insumos de calidad, que permite maximizar la producción de embriones (Nagao et al., 1995). Nedambale et al. (2004) demostró que la adición de BSA y suero fetal bovino en los medios de cultivo (SOFaa y KSOMaa) mejora la tasa de blastocistos (31% y 28%) al día 7, respectivamente. Asimismo, se reportó efecto benéfico del BSA en estadios tempranos y suero fetal bovino en estadios avanzados del desarrollo embrionario (Tricoire et al., 1999). Además, el medio de cultivo SOFaa en la mayoría de los protocolos contiene ácido cítrico, myoinositol y SFB, que contribuyen en el desarrollo de los embriones bovinos, en comparación con el medio KSOMaa que no los posee. Siendo la concentración de BSA en KSOMaa es menor que en SOFaa Estas diferencias podrían influir en el desarrollo embrionario hasta los estadios finales y su calidad (Mejía et al., 2009; Wrenzycki et al., 2001).

Es importante comprender cuáles son los principales requerimientos nutricionales para el cultivo in vitro, que maximiza mayor rendimiento embrionario (Barnett & Bavister, 1996). Siendo la etapa de desarrollo embrionario entre cigoto a blastocisto, clave para la capacidad implantatoria de los embriones (Lonergan et al., 2003).

Los embriones provenientes de la producción de embriones in vitro de alpaca en diferentes estadios de desarrollo se pueden observar en la figura 2.



**Figura 2.** Embriones de alpaca a diferentes estadios de desarrollo: A) (2 células), B) (4 células), C) (16 células), D) Mórula temprana E) Mórula compacta F) Blastocisto temprano, G) Blastocisto expandido.

En camélidos, hay escasas publicaciones donde evalúen la calidad morfológica de los embriones. Sin embargo, en vicuñas, Cárdenas & Sapana (2015) recuperaron 55.56% de embriones vivo de calidad excelente, 44.44% buena y 11.11% de regular calidad, respectivamente. Similares resultados indica Pacheco et al. (2016) con un 57.2% de embriones de calidad excelente y 23.8% de embriones de calidad buena en alpacas.

Los resultados de calidad embrionaria obtenidos en el presente estudio difieren con los resultados obtenidos por Catari. (2018) donde para medio SOFaa y KSOMaa: obtiene calidad Excelente 16.1% y 5.8%, de calidad Buena 13.8% 11.6%, de calidad Regular 5.7% y 9.3% y de mala calidad 64.4% y 73.3% respectivamente. Así mismo, en bovinos Pahura. (2015), reporta para el medio SOFaa y KSOMaa según calidad Excelente y Buena 3.03% y 0%, Regular 8.69% y 6.32%, Mala 6.62% y 6.84, degenerados 81.66% y 86.84% respectivamente. Varios trabajos demostraron que la composición de los medios de cultivo afecta la calidad del embrión (Takahashi & First, 1992). Aunque, es de conocimiento de los laboratorios que los embriones obtenidos in vitro son más sensibles a diferentes factores por lo que son menor calidad a los producidos in vivo (Lonergan et al., 2003).

Existen diferencias en la expresión génica entre embriones in vitro e in vivo, lo que puede explicar las diferencias de calidad observadas. Wrenzycki et al. (1996) demostraron que la expresión del gen de la conexina 43 en la etapa de blastocisto difiere entre los embriones bovinos producidos in vitro y los producidos in vivo. Este gen está involucrado en la formación de una proteína que da lugar a uniones gap entre células. La formación deficiente de uniones gap se asocia con una compactación celular deficiente y es una ocurrencia común en los embriones FIV. Además, el desarrollo acelerado in vitro debido a la adición de suero (Carolan et al., 1995; Lonergan et al., 1999) puede afectar la regulación y transcripción de genes, lo que resulta en anomalías del desarrollo bien documentadas, como el sobredimensionamiento fetal en bovinos (Young et al., 1998). También se ha demostrado que la expresión génica en el embrión en desarrollo puede verse influida por el ambiente de cultivo in vitro (Wrenzycki et al., 1999; Natale et al., 2000). Además, el entorno de cultivo puede tener un efecto significativo sobre el metabolismo del embrión, lo que tiene implicaciones en la calidad del embrión (Krisner et al., 1999).

## CONCLUSIÓN

El medio de cultivo KSOMaa y SOFaa pueden ser utilizados en la producción de embriones in vitro de alpacas.

## Contribuciones de autores

Preparación y ejecución: (IMLA, MC), Desarrollo de la metodología: (IMLA, MC) Concepción y diseño: (IMLA) Edición del artículo (IMLA, MC, CO) Supervisión del estudio: (IMLA,MC,CO)

## REFERENCIAS

1. Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev.* 2002; 61(1):57-66. <https://doi.org/10.1002/mrd.1131>
2. Arav A, Zeron Y, Leslie SB, Behboodi E, Anderson GB, Crowe JH. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. *Cryobiology* 1996; 33: 589-599
3. Arriaga I, Huanca W, Terreros M, Becerra JJ, 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. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 2014; 25(4), 477-486. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10783>
4. Barnett DK, Bavister BD. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Mol. Reprod. Dev.* 1996; 43, 105-133.
5. Bó GA, Mapletoft RJ. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim Reprod AR.* 2018; 10(3):344-8.
6. Cárdenas O, Sapana R. Algunas características de los embriones colectados de vicuña (*Vicugna vicugna*) en el CIP Quimsachata del INIA PUNO. *Rev Investig Altoandinas.* 2015; 17(3):449-52. doi: 10.1827/ria.2015.162
7. Carolan C, Lonergan P, Van Langendonck A, Mermillod P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology.* 1995; 43(6):1115-28.
8. Catari ME. 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]]: Universidad Nacional del Altiplano 2018.
9. 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>
10. De Loos F, Van Vliet C, van Maurik P v, Kruip TA. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res.* 1989; 24(2):197-204. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120240207>
11. 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)
12. Fernández G, Moreira P, Bilbao A, Jiménez A, Pérez-Crespo M, Ramírez MA, et al. Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc Natl Acad Sci.* 2004; 101(16):5880-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308560101>
13. Feugang JM, Camargo O, Memili E. Culture systems for bovine embryos. *Livestock Science* 121 5. 141–149 -. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.06.019>

14. Gomez OE, Choque D, Henao F, Escobedo MH, Velarde N. Comparación de tres métodos de recuperación de Complejos Ovocito-Cúmulus (COCs) de alpaca recuperados de ovarios postmortem en un Camal. *Spermova*. 2013; 3(1):103-4.
15. Gonella A, Atuesta J, Bernal S, Chacon L. Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro. *Rev Investig Agrar Ambient*. 2013; 4(1):65-80. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6285691>
16. Holm P, Booth PJ, Callesen H. Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo-and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reprod-Camb-*. 2002; 123(4):553-65.
17. Huanca LW, Condori PR, Chileno M, García HP, Cainzo J, Becerra GJJ. Evaluación de Cuatro Tiempos de Cultivo sobre la Tasa de Maduración y División Postfecundación in vitro de Ovocitos de Alpaca. *Rev Investig Vet Perú*. Diciembre de 2014; 25(4):468-76. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10782>
18. Huanca W, Adams GP. Semen collection and artificial insemination in llamas and alpacas. En: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology: Second Edition*. 2006.
19. Huanca W, Cordero A, Huanca T, Cardenas O, Adams GP, Ratto MH. Ovarian response and embryo production in llamas treated with equine chorionic gonadotropin alone or with a progesterin-releasing vaginal sponge at the time of follicular wave emergence. *Theriogenology*. 2009; 72(6):803-8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.05.019>
20. Huanca W, Palomino JM, Cervantes M, Cordero A, Huanca T. Efecto de temperaturas de transporte (35° C, 4° C) sobre la calidad morfológica de ovocitos colectados desde ovarios de alpacas. En: *Res. XX Reunión ALPA. Cusco, Perú 2007*.
21. Knijn HM, Wrenzycki C, Hendriksen PJM, Vos P, van der Weijden GC, Niemann H, et al. Effects of in vitro versus in vivo maturation on gene expression in single bovine blastocysts. *Theriogenology*. 2001; 55: 238.
22. Krisner RL, Lane M, Bavister BD. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biol Reprod*. 1999;60(6):1345-52. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.6.1345>
23. Landeo L, Ramos Y, Artica M, Ruiz J. Efecto del medio de cultivo sobre el desarrollo de embriones in vitro de alpacas. *XL Reunión Científica de la Asociación Peruana de Producción Animal. Chachapoyas. Perú. 2017*.
24. Lonergan P, O'Kearney-Flynn M, Boland MP. Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. *Theriogenology*. 1999; 51(8):1565-76. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00099-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00099-0)
25. Lonergan P, Rizos D, Gutierrez AA, Moreira P, Pintado B, De la Fuente J, et al. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Biology of Reproduction*. 2003;69 1424-1431. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.018168>
26. Matsushita S, Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. Effect of low-temperature bovine ovary storage on the maturation rate and developmental potential of follicular oocytes after in vitro fertilization, parthenogenetic activation, or somatic cell nucleus transfer. *Anim Reprod Sci* 2004; 84: 293-301
27. Mejía VI, Arango DS, Pareja LA, Camargo RO, Urrego AR. Evaluación de dos medios de cultivo sobre la producción in vitro de embriones bovinos. *Rev CES Med Vet Zootec*. 2009; 4(2):39-46.
28. Miragaya MH, Chaves MG, Agüero A. Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Rumin Res*. 2006; 61(2-3):299-310. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.017>
29. Nagao Y, Sæki K, Hoshi M, Takahashi Y, Kanagawa H. Effects of water quality on in vitro fertilization and development of bovine oocytes in protein-free medium. *Theriogenology*. 1995; 44(3):433-44. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00197-G](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00197-G)
30. Natale DR, Kidder GM, Westhusin ME, Watson AJ. Assessment by differential display-RT-PCR of mRNA transcript transitions and  $\alpha$ -amanitin sensitivity during bovine preattachment development. *Mol Reprod Dev*. 2000; 55(2):152-63.
31. Nedambale TL, Dinnyés A, Yang X, Tian XC. Bovine blastocyst development in vitro: timing, sex, and viability following vitrification. *Biol Reprod*. 2004; 71(5):1671-6. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.027987>
32. Pacheco J, Vélez V, Pezo D. Evaluación de la eficiencia de la transferencia de embriones interespecie entre alpacas y llamas obtenidos por ovulación simple. *Rev Investig Vet Perú*. 2016; 27(1):64-9. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v27i1.11464>
33. Pahuara LE. Evaluación de dos protocolos para la producción in vitro de embriones bovinos *Bos taurus* en la región de Ayacucho, 2012-2013. [[Tesis Pregrado]]: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad de Ciencias Biológicas 2015.
34. Quintanilla L, Huanca W, Córdova A, Ampuero A, Benavides L. Efecto de la Suplementación del Medio de Maduración con Cisteamina y de Dos Medios de Cultivo (KSOMaa y SOF) en la Fecundación in vitro de Ovocitos Bovinos. *Rev Investig Vet Perú*. 2015;26(3):462-8. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i3.11178>
35. 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>
36. Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First NL, Parrish JJ, Memili E. Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*. 2006; 131(5):895-904. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01021>
37. 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.
38. Takahashi Y, First NL. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*. 1992;37(5):963-78. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90096-A](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90096-A)

39. Tricoire H, Touze JL, Mermillod P. Effect of fetal calf serum on the quality of in vitro produced cattle embryos. *Theriogenology*. 1999; 51(1):257.
40. Wang YS, Zhao X, Su JM, An ZX, Xiong XR, Wang LJ, Liu J. Lowering storage temperature during ovary transport is beneficial to the developmental competence of bovine oocytes used for somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci*. 2011; 124: 48-54.doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.01.015
41. Włodarczyk D, Bukowska D, Jackowska M, Mucha S, Jaskowski JM. 2009. In vitro maturation and degeneration of domestic cat oocytes collected from ovaries stored at various temperatures. *Vet Med-Czech* 2009; 54: 491-497.
42. Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol Reprod Dev Inc Gamete Res*. 1999;53(1):8-18. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199905\)53:1<8::AID-MRD2>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199905)53:1<8::AID-MRD2>3.0.CO;2-K)
43. Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H. Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Reproduction*. 1996; 108(1):17-24. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1080017>
44. Wrenzycki C, Herrmann D, Keskintepe L, Martins Jr A, Sirisathien S, Brackett B, et al. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod*. 2001;16(5):893-901. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.893>
45. Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod*. 1998;3(3):155-63. DOI: 10.1530/ror.0.0030155
46. Fischer-Brown A, Crooks A, Leonard S, Monson R, Northey D, Rutledge JJ. Parturition following transfer of embryos produced in two media under two oxygen concentrations. *Animal reproduction science*, 2005;87(3-4), 215-228.
47. Palomino GW, Contreras M, Olaguivel C. Efecto de la suplementación de dos agentes capacitantes en medio de fecundación para la producción in vitro de embriones en alpacas (Vicugna pacos). *Spermova* 2020; 10(1): 32-37. DOI. 10.18548/aspe/0008.05