

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL



**“INFLUENCIA DE LOS MEDIOS Y PROPORCIÓN HORMONAL
EN EL FLUIDO FOLICULAR SOBRE LA COMPETENCIA DE
OVOCITOS DE ALPACA *in vitro*”**

Presentada por:

DELO DALISON HUAMANÍ MALLMA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIA ANIMAL**






Lima - Perú

2022

Document Information

Analyzed document	tesis doct 20.0_Delo.pdf (D145085482)
Submitted	2022-09-29 01:03:00
Submitted by	Henry William Vivanco Mackie
Submitter email	hwivanco-mackie@lamolina.edu.pe
Similarity	2%
Analysis address	hwivancomackie.unalm@analysis.arkund.com

Sources included in the report

SA	TESIS CORREGIDA.docx Document TESIS CORREGIDA.docx (D54968041)		4
SA	Paula García. La razón 2D-4D como biomarcador de reserva ovárica y de respuesta a la estimulación en ciclos de FIV.pdf Document Paula García. La razón 2D-4D como biomarcador de reserva ovárica y de respuesta a la estimulación en ciclos de FIV.pdf (D140194394)		1
SA	MATORRAS_ALONSO_ MARTA INFLUENCIA DE LA PUNCIÓN DE PRGF.pdf Document MATORRAS_ALONSO_ MARTA INFLUENCIA DE LA PUNCIÓN DE PRGF.pdf (D140954443)		1
W	URL: https://academic.oup.com/humrep/article/18/12/2575/2913447 Fetched: 2019-12-02 11:15:14		1
SA	Asunta_Martínez_Dinámica_y_selección_folicular.pdf Document Asunta_Martínez_Dinámica_y_selección_folicular.pdf (D99103675)		2
SA	TESIS Rodrigo X. López Cabrera .docx Document TESIS Rodrigo X. López Cabrera .docx (D87743459)		1
SA	Júlia Laborda - Marcadores calidad ovocitaria.pdf Document Júlia Laborda - Marcadores calidad ovocitaria.pdf (D92982182)		10
SA	BORRALLO TORIBIO JAIME - TFE.pdf Document BORRALLO TORIBIO JAIME - TFE.pdf (D141438166)		3
SA	Pablo Jimenez Clemente AMH.docx Document Pablo Jimenez Clemente AMH.docx (D141023885)		1
SA	Tesis 02 Veliz y Pincay.docx Document Tesis 02 Veliz y Pincay.docx (D55217011)		1

Entire Document

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL**

**“INFLUENCIA DE LOS MEDIOS Y PROPORCIÓN HORMONAL
EN EL FLUIDO FOLICULAR SOBRE LA COMPETENCIA DE
OVOCITOS DE ALPACA *in vitro*”**

**Tesis para optar el grado de doctor
*DOCTORIS PHILOSOPHIAE***

Presentada por:

DELO DALISON HUAMANÍ MALLMA

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

**Ph.D. José Alberto Barrón López
PRESIDENTE**

**Ph.D. William Vívanco Mackie
ASESOR**

**Ph.D. Juan Chávez Cossío
MIEMBRO**

**Ph.D. Gustavo Gutiérrez Reynoso
MIEMBRO**

**Ph.D. Manuel Guido Perez Durand
MIEMBRO EXTERNO**

DEDICATORIA

A mi abuela Victoria, quien siempre
confió en mí y me apoyo en tiempos
guerra.

A mi madre Delia, por su constante
coraje y su amor hacia el
aprendizaje.

A mi padre Erasmo, por su
inagotable apoyo emocional.

A mis hermanos, por lo buenos
momentos de reflexión y debate.

AGRADECIMIENTO

Al profesor William Vivanco por su apoyo incondicional y asesoría de la tesis doctoral, a los profesores Alberto Barrón, Juan Chávez, Gustavo Gutiérrez y Guido Pérez, miembro del comité consejero, por sus constantes sugerencias y apoyo desinteresado, les quedo muy agradecido.

A la escuela de post-grado de la Universidad Nacional Agraria La Molina y su cuerpo docente, por haberme acogido en sus instalaciones y darme la oportunidad de profundizar mis conocimientos en Ciencia Animal durante mis estudios doctorales.

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), por haberme dado la oportunidad de ser Becado por su institución, financiado mis estudios y la tesis doctoral.

A la Universidad Nacional del Altiplano – PUNO, por facilitarme sus instalaciones, al Profesor Guido Pérez, Harold Pérez, Alberto Ruelas, Fidel Gutiérrez, Danny Medina, por el apoyo durante la ejecución de la tesis doctoral.

A la INIA-Donoso, por abrirme la puerta de sus laboratorios, a Cesar Osorio, Marco Pariona, Marlene Miguel, Daniel Ponce, Rolando Mamani y Silvia León por todo el apoyo brindado.

A mis queridos compañeros del doctorado, a Misael Rodríguez, Deysi Dipaz, Jhorjhi Vega, Rubén Pinares y Samuel Pizarro, con quienes compartimos carpetas, días de estudio y buenas aventuras.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1.	EL OVOCITO.....	4
2.1.1.	Biología celular del ovocito.....	8
2.1.2.	La fase de crecimiento de la ovogénesis	13
2.1.3.	Fase de maduración de la ovogénesis	19
2.2.	MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> DE OVOCITOS	20
2.2.1.	Cambios estructurales del ovocito en IVM.....	21
2.3.	FLUIDO FOLICULAR Y CALIDAD DEL OVOCITO.....	22
2.3.1.	Hormonas	23
2.3.2.	Factores de crecimiento de la superfamilia de factores de crecimiento transformante beta (TGF- β)	24
2.3.3.	Otros factores de crecimiento e interleucinas	27
2.3.4.	Especies reactivas de oxígeno	27
2.3.5.	Factores antiapoptóticos.....	27
2.3.6.	Proteínas, péptidos y aminoácidos	28
2.3.7.	Azúcares.....	28
2.3.8.	Prostanoides	28
2.4.	FUNCIONES E INTERACCIONES ENTRE LAS HORMONAS Y LA OVOGÉNESIS	29
2.4.1.	Análisis de estradiol, progesterona, testosterona y hormona antimülleriana	30
2.4.2.	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)	31
2.5.	EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL OVOCITO.....	34
2.5.1.	Evaluación morfológica del ovocito	35
2.5.2.	Determinación de la maduración del ovocito mediante tinción Hoechst.....	37
2.5.3.	Determinación de la maduración del ovocito mediante tinción brillante de azul de cresilo	39
2.5.4.	Análisis de apoptosis del ovocito mediante tinción con Anexina V/PI.....	40
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	42
3.1.	REACTIVOS QUÍMICOS Y DECLARACIÓN DE ÉTICA.....	42
3.2.	DECLARACIÓN DE ÉTICA.....	42

3.3. UBICACIÓN Y ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	42
3.4. OVOCITOS DERIVADOS DEL CAMAL DE NUÑO	42
3.5. MEDIO DE CULTIVO DE MADURACIÓN.....	43
3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL	44
3.7. MADURACIÓN DE OVOCITOS	44
3.8. EVALUACIÓN MORFOMÉTRICA DE OVOCITOS	45
3.9. EVALUACIÓN DE LA MADURACIÓN NUCLEAR	45
3.10.EVALUACIÓN DE LA MADURACIÓN CITOPLASMÁTICA	45
3.11.EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS	45
3.12.MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE ESTRADIOL	46
3.13.MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA.....	46
3.14.MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE TESTOSTERONA	47
3.15.MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA	47
3.16.ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
4.1. RESULTADOS	50
4.1.1. Efecto de los dos medios de maduración sobre la morfometría de los ovocitos	50
4.1.2.Efecto de los dos medios en la maduración nuclear de ovocitos	54
4.1.3. Efecto de los dos medios sobre la maduración citoplasmática del ovocito	55
4.1.4. Efecto de los dos medios de maduración sobre la apoptosis	58
4.1.5. Concentración de E2, P4, T2 y AMH en el líquido folicular.....	58
4.1.6. Correlaciones entre las concentraciones de hormonas E2, P4, T2 y AMH en el líquido folicular	66
4.1.7. Relación entre la concentración de hormonas E2/P4 y E2/T2 en el líquido folicular	67
4.2. DISCUSIÓN	68
4.2.1. Evaluación la influencia de los medios de maduración <i>in vitro</i> en la producción de ovocitos de alpaca competentes.....	68
4.2.2. Determinación de las concentraciones y proporciones de hormonas esteroides sexuales y hormona antimülleriana en el líquido folicular de alpacas según el diámetro folicular	71
V. CONCLUSIONES	75
VI. RECOMENDACIONES	76
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
VIII. ANEXOS	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del ovocito	4
Figura 2. Etapas de la ovogénesis definida en base al estado del ciclo celular del ovocito..	7
Figura 3. El núcleo inmaduro de ovocitos de mamífero o vesícula germinal (GV).....	9
Figura 4. Aspecto ultraestructural de laminillas anuladas en un ovocito primario de chimpancé visto en la sección transversal (A) y vistas tangenciales (B)	11
Figura 5. Membranas y capas extracelulares en óvulos de mamíferos.....	13
Figura 6. Modificaciones epigenéticas de la cromatina durante la ovogénesis	15
Figura 7. Sitios de unión de la AMH en la foliculogénesis	26
Figura 8. Contribuciones directas de los componentes del folículo antral a la diferenciación de ovocitos.....	29
Figura 9. Espectros de absorción y emisión de fluorescencia de Hoechst 33342 cuando se une al ADN.....	38
Figura 10. Modo de unión al ADN y estructuras químicas de los tintes Hoechst.....	39
Figura 11. Esquema de los experimentos	44
Figura 12. Análisis morfométrico de ovocitos de alpaca madurados in vitro	50
Figura 13. Medición del diámetro del ovocito (μm) después de la maduración in vitro usando dos medios de maduración; MM1 y MM2	51
Figura 14. Medición del espesor de la zona pelúcida (μm) después de la maduración in vitro usando dos medios de maduración; MM1 y MM2.....	52
Figura 15. Medición del área del espacio perivitelino (μm) después de la maduración in vitro usando dos medios de maduración; MM1 y MM2	53

Figura 16. Clasificación de la maduración nuclear en ovocitos de Alpaca	54
Figura 17. Medida de maduración nuclear (%) después de la maduración in vitro usando dos medios de maduración; MM1 y MM2	55
Figura 18. Clasificación de la maduración citoplasmática en ovocitos de Alpaca Maduración citoplasmática mediante tinción BCB	56
Figura 19. Medida de la maduración citoplasmática (%) después de la maduración in vitro usando dos medios de maduración; MM1 y MM2.....	56
Figura 20. Microfotografía de fluorescencia de ovocitos tras maduración in vitro con anexina V/PI.....	57
Figura 21. Intensidad de fluorescencia de ovocitos madurados in vitro utilizando dos medios de maduración; MM1 y MM2	58
Figura 22. Curva estándar E2	59
Figura 23. Concentración de E2 en líquido folicular.....	60
Figura 24. Curva estándar de P4.....	61
Figura 25. Concentración de P4 en líquido folicular.....	62
Figura 26. Curva estándar de T2	63
Figura 27. Concentración de T2 en líquido folicular.....	64
Figura 28. Curva estándar de AMH.....	65
Figura 29. Concentración de AMH en líquido folicular.....	66
Figura 30. Relación E2/P4 y E2/T2 en el líquido folicular	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Competencias adquiridas por los ovocitos de mamíferos durante la ovogénesis....	5
Tabla 2. Genes de efectos maternos identificados en ovocitos de mamíferos.....	16
Tabla 3. Agentes bloqueantes utilizados en el sistema ELISA	32
Tabla 4. Etiquetas enzimáticas, cromóforos y condiciones de parada en ELISA	32
Tabla 5. Sustratos y cromóforos de uso común en ELISA.....	33
Tabla 6. Resumen de predictores potenciales de calidad de ovocitos	34
Tabla 7. Medios de cultivo utilizados para la maduración de los ovocitos	43

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Fotografía de ovarios de alpacas.....	95
Anexo 2. Fotografía de la cámara de atemperamiento de ovocitos, los medios de cultivo, medio de lavados y aceite para laboratorio a 38.5 °C.....	95
Anexo 3. Aplicación de la tinción acetato-orceína sobre los ovocitos.....	96
Anexo 4. Fotografía de los medios de cultivo para la maduración in vitro.....	96
Anexo 5. Espectrofotómetro para la dedición de hormonas.....	97
Anexo 6. Microscopio de fluorescencia para la medición de apoptosis.....	97
Anexo 7. Kits para determinar la apoptosis.....	98
Anexo 8. Reacción de los anticuerpos monoclonales y las hormonas reproductivas.....	98
Anexo 9. Kit de ELISA de Testosterona para determinar la concentración de hormonas ..	99
Anexo 10. Kit de ELISA de Progesterona para determinar la concentración de hormonas ..	99
.....	99
Anexo 11. Artículo publicado en Journal of Animal Science and Reasearch.....	100

RESUMEN

La aplicación de biotecnologías reproductivas requiere cantidades significantes de ovocitos maduros viables; sin embargo, existen pocos estudios utilizando indicadores de calidad ovocitaria. Por lo tanto, el objetivo de investigación fue determinar la influencia de los medios de maduración y proporción hormonal en el fluido folicular sobre la competencia de ovocitos de alpaca *in vitro*. Los ovarios de alpaca (n = 58) se obtuvieron del matadero, se transportaron al laboratorio en termos con solución salina a 33-36 °C y se sometieron a aspiración folicular. El líquido folicular aspirado según diámetro folicular fue centrifugado y almacenado a -20 °C hasta determinar las concentraciones hormonales mediante ELISA. Por otro lado, se obtuvieron un total de 532 ovocitos. Los ovocitos fueron seleccionados, aleatorizados y distribuidos en uno de los dos grupos experimentales (Medio de maduración 1 (MM1) y Medio de maduración 2 (MM2)) con tres repeticiones por experimento. La maduración *in vitro* se llevó a cabo en una incubadora portátil durante 40 h en condiciones de 5% de CO₂ (producido por gránulos efervescentes) y 38,5 °C (por baño termostático). La maduración nuclear se evaluó mediante tinción con acetato de orceína, la maduración citoplasmática mediante tinción con azul de cresilo brillante (BCB), la apoptosis mediante la tinción anexina V/IP y la morfometría mediante Image J Software. La maduración nuclear se clasificó según la etapa meiótica. La maduración citoplasmática se clasificó por la presencia (BCB+) o ausencia (BCB-) del BCB. La apoptosis se midió según la intensidad de fluorescencia (%). La morfometría se evaluó midiendo el diámetro, espesor de la zona pelúcida y el área del espacio perivitelino del ovocito. Los resultados de las concentraciones hormonales fueron 3115,34 ± 940,35 pg/ml para estrógeno (E2), 827,45 ± 419,44 pg/ml para progesterona (P4), 5,88 ± 5,57 ng/ml para testosterona (T2) y 1,10 ± 0,48 ng/ml para la hormona antimülleriana (AMH), encontrando correlaciones positivas entre las concentraciones de E2 y P4 (r = 0,099; P = 0,772), E2 y T2 (r = 0,574; P = 0,065), E2 y AMH (r = 0,180; P = 0,618), P4 y T2, (r = 0,091; P = 0,790) T2 y AMH (r = 0,192; P = 0,413), pero correlación negativa entre P4 y AMH (r = -0,265; P = 0,459). Los niveles de E2 en el líquido folicular están en el rango informado por otros investigadores. En folículos mayores de 15 mm se encontraron niveles bajos de E2 y T2. Las concentraciones de P4 en

el líquido folicular a los diferentes diámetros foliculares no fueron diferentes ($P > 0.05$); lo mismo, se observó para los niveles de AMH en el líquido folicular que no fueron diferentes entre folículos de diferente diámetro ($P > 0.05$). Además, se encontraron proporciones altas de E2/P4 y bajas de E2/T2 en folículos que oscilaban entre 4 y 10 mm. La tasa de maduración nuclear en metafase II, no muestran diferencias significativas ($P = 0.088$) entre MM1 (46.08 ± 5.90 %) y MM2 (54.65 ± 3.00 %). La tasa de maduración citoplasmática de MM1 (67.78 ± 4.50 %) fue significativamente menor comparado con MM2 (77.61 ± 3.58 %) ($P = 0.014$). Los resultados de la anexina V mostraron diferencias significativas ($P = 0.0057$) entre MM1 (51.95 ± 33.23 %) y MM2 (12.95 ± 2.34 %); mientras, los resultados de yoduro de propidio en MM1 (16.57 ± 6.98 %) y MM2 (15.81 ± 3.06 %) no presentaron diferencias significativas ($P = 0.8124$). Para el diámetro del ovocito, MM1 (133.42 ± 14.56 μm) y MM2 (136.14 ± 15.2 μm) no fueron significativos ($P = 0.397$), lo mismo para el grosor de la zona pelúcida, MM1 (16.84 ± 3.96 μm) y MM2 (16.73 ± 4.98 μm) no fueron diferentes ($P = 0.919$); sin embargo, el área del espacio perivitelino, MM1 (11018.91 ± 2465.40 μm^2) y MM2 (8686.18 ± 3016.88 μm^2) presentaron diferencias significativas ($P = 0.0005$). Se concluye que los ovocitos entre 4 y 10 mm podrían ser adecuados para el cultivo *in vitro*; además, el medio de cultivo MM2 presenta mejores resultados para la obtención de ovocitos viables.

Palabras clave: Alpaca, hormonas reproductivas, maduración *in vitro*, ovocitos viables.

ABSTRACT

The application of reproductive biotechnologies requires significant amounts of viable mature oocytes; however, there are few studies using indicators of oocyte quality. Therefore, the research objective was to determine the influence of the maturation media and hormonal ratio in the follicular fluid on the competence of alpaca oocytes *in vitro*. Alpaca ovaries (n = 58) were obtained from the slaughterhouse, transported to the laboratory in thermos with saline solution at 33-36 °C and subjected to follicular aspiration. The follicular fluid aspirated according to follicular diameter was centrifuged and stored at -20 °C until hormone concentrations were determined by ELISA. On the other hand, a total of 532 oocytes were obtained. The oocytes were selected, randomized and distributed in one of the two experimental groups (Maturation Medium 1 (MM1) and Maturation Medium 2 (MM2)) with three repetitions per experiment. *In vitro* maturation was carried out in a portable incubator for 40 h under conditions of 5% CO₂ (produced by effervescent granules) and 38.5 °C (by thermostatic bath). Nuclear maturation was assessed by orcein acetate staining, cytoplasmic maturation by brilliant cresyl blue (BCB) staining, apoptosis by annexin V/PI staining, and morphometry by Image J Software. Nuclear maturation was classified according to the meiotic stage. Cytoplasmic maturation was classified by the presence (BCB+) or absence (BCB-) of the BCB. Apoptosis was measured according to fluorescence intensity (%). Morphometry was evaluated by measuring the diameter, thickness of the zona pellucida and the area of the perivitelline space of the oocyte. The results of the hormone concentrations were 3115.34 ± 940.35 pg/ml for estrogen (E2), 827.45 ± 419.44 pg/ml for progesterone (P4), 5.88 ± 5.57 ng/ml for testosterone (T2) and 1.10 ± 0.48 ng/ml for antimüllerian hormone (AMH), finding positive correlations between the concentrations of E2 and P4 (r = 0.099; P = 0.772), E2 and T2 (r = 0.574 ; P = 0.065), E2 and AMH (r = 0.180; P = 0.618), P4 and T2, (r = 0.091; P = 0.790) T2 and AMH (r = 0.192; P = 0.413), but negative correlation between P4 and AMH (r = -0.265, P = 0.459). E2 levels in the follicular fluid are in the range reported by other investigators. In follicles larger than 15 mm, low levels of E2 and T2 were found. The concentrations of P4 in the follicular fluid at the different follicular diameters were not different (P>0.05); the same was observed for AMH levels in follicular

fluid that were not different between follicles of different diameter ($P>0.05$). In addition, high E2/P4 and low E2/T2 ratios were found in follicles ranging from 4 to 10 mm. The rate of nuclear maturation in metaphase II does not show significant differences ($P=0.088$) between MM1 ($46.08 \pm 5.90\%$) and MM2 ($54.65 \pm 3.00\%$). The cytoplasmic maturation rate of MM1 ($67.78 \pm 4.50\%$) was significantly lower compared to MM2 ($77.61 \pm 3.58\%$) ($P = 0.014$). Annexin V results showed significant differences ($P = 0.0057$) between MM1 ($51.95 \pm 33.23\%$) and MM2 ($12.95 \pm 2.34\%$); meanwhile, the results of propidium iodide in MM1 ($16.57 \pm 6.98\%$) and MM2 ($15.81 \pm 3.06\%$) did not present significant differences ($P = 0.8124$). For the diameter of the oocyte, MM1 ($133.42 \pm 14.56 \mu\text{m}$) and MM2 ($136.14 \pm 15.2 \mu\text{m}$) were not significant ($P=0.397$), the same for the thickness of the zona pellucida, MM1 ($16.84 \pm 3.96 \mu\text{m}$) and MM2 ($16.73 \pm 4.98 \mu\text{m}$) were not different ($P = 0.919$); however, the perivitelline space area, MM1 ($11018.91 \pm 2465.40 \mu\text{m}^2$) and MM2 ($8686.18 \pm 3016.88 \mu\text{m}^2$) presented significant differences ($P=0.0005$). It is concluded that oocytes between 4 and 10 mm could be suitable for in vitro culture; In addition, the MM2 culture medium presents better results for obtaining viable oocytes.

Keywords: Alpaca, reproductive hormones, in vitro maturation, viable oocytes.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos del uso de tecnologías reproductivas avanzadas es aumentar la tasa de reproducción de animales reproductores de alto valor genético. En alpacas, el uso de técnicas de biotecnología reproductiva es limitada; probablemente se deba a las complejas características reproductivas de las alpacas a nivel anatómico y fisiológico (Brown 2000) además de no disponer del suficiente financiamiento para la investigación (Trasorras *et al.* 2013). Sin embargo, en las últimas décadas se ha venido prestando atención a los estudios básicos y aplicados de estas tecnologías debido al mayor reconocimiento del mercado a la excelente calidad de la fibra de alpaca. A nivel nacional, solo el 8 por ciento de las alpacas son aceptables para la industria, requiriendo finuras menores a 22 micrones (Huanca *et al.* 2014). Aun se requiere mayor implementación de programas de mejoramiento genético, como también, programas de investigación y desarrollo (I+D) (Miragaya *et al.* 2006) que ayuden a generar mayores ingresos económicos para los pobladores altoandinos.

Las alpacas y camélidos sudamericanos en general tienen una baja eficiencia reproductiva, alrededor del 50 por ciento de las hembras no producen descendencia dentro de un año, el 50 por ciento de los embriones mueren en el primer mes de gestación (Fernandez-Baca *et al.* 1970) y el 20 por ciento de las hembras no logran quedar preñadas después del apareamiento (Brown 2000). Por lo tanto, se necesita una comprensión más completa de la fisiología reproductiva de la alpaca sobre todo en foliculogénesis, ovogénesis, maduración del ovocito, el estro, la inducción de la ovulación, la formación y la regresión del cuerpo lúteo (CL) que puedan conducir a la mejora de la calidad y viabilidad de los ovocitos (Brown 2000).

En alpacas, la obtención de embriones *in vivo* mediante superovulación y lavado uterino posee un rendimiento promedio de 4.75 embriones por hembra (Martorell 2000). La primera producción exitosa *in vitro* reportó rendimientos de 8 por ciento de embriones transferibles (en estadio de mórula y blastocisto), a partir de ovocitos de matadero madurados y fertilizados con espermatozoides congelados obtenidos del epidídimo (Gamarra *et al.* 2009). Un estudio reciente muestra una tasa de blastocistos de 29.7 ± 3.8 por ciento (Ruiz *et al.* 2017), siendo un progreso significativo, pero aún la tecnología de producción de embriones

in vitro en alpacas requiere mejoras adicionales en comparación con otras especies domésticas.

Uno de los factores que limitan el desarrollo de la tecnología de producción de embriones *in vitro* en alpacas es la baja disponibilidad de ovocitos debido al pequeño número de hembras sacrificadas y las características reproductivas únicas que no permiten extrapolar directamente los sistemas de cultivo de embriones de otras especies (Skidmore *et al.* 2020). Además, en el Perú no existen muchos mataderos legales y la frecuencia de sacrificio llega a un día a la semana en el mejor de los casos. El mayor lugar de beneficio de camélidos en el Perú se encuentra en el Distrito de Nuñoa, de la región Puno.

La maduración del ovocito es el proceso más crítico en el cultivo *in vitro*, puesto que, adquiere competencia para procesos futuros, que implican la reanudación de la meiosis, regulación epigenética, bloqueo de la polispermia, activación del cigoto, intercambio de protaminas a histonas, clivaje, polarización celular, proliferación e implantación de células madre embrionarias (Plant & Zeleznik 2015).

Los ovocitos se pueden recolectar de hembras con o sin terapia hormonal para el desarrollo folicular múltiple, mediante aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonido, conocida como “Ovum Pick Up” (OPU), aspiración folicular de ovarios expuestos por laparotomía, aspiración folicular a través de laparoscopia o por aspiración folicular de ovarios obtenidos de animales sacrificados, siendo este último el método con que se obtiene un mayor número de “complejos cúmulo-ovocito” (COCs) mediante aspiración secuencial usando jeringas y disección del ovario (Del Campo *et al.* 1994). Sin embargo, se obtienen poblaciones heterólogas de folículos preantrales y antrales, muchos de los cuales, podrían haber sufrido atresia y cambios apoptóticos irreversibles que repercutirán en una disminución en la tasa de maduración *in vitro* (Moniruzzaman & Miyano 2010).

Para que los ovocitos logren la maduración, toda la maquinaria molecular debe estar regulada en el espacio y tiempo, logrando así la transición de la vesícula germinal a la metafase II, además de la producción y almacenamiento de transcritos para su uso en la fecundación y primeras divisiones del embrión hasta activación de genes cigóticos (Kitajima *et al.* 2011).

Los eventos que conducen a la obtención de un ovocito maduro de calidad están dados por una interacción compleja y dinámica entre éste y el folículo antral, donde participan células somáticas (teca, granulosa y cúmulo), lámina basal y líquido folicular (FF). Durante este proceso, el ovocito debe completar su crecimiento final y su maduración nuclear y

citoplasmática (Hennet & Combelles 2012). La maduración *in vitro* en alpacas se lleva a cabo comúnmente mediante la extrapolación de medios de cultivo de bovinos a alpacas, generando resultados muy variados (Leisinger *et al.* 2014).

La aplicación de biotecnologías reproductivas avanzadas, como la maduración *in vitro*, la fecundación *in vitro*, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, el cultivo de embriones *in vitro*, la clonación y la transgénesis requieren ovocitos de calidad. Actualmente, existen predictores morfológicos de la calidad de los COCs (complejos cumulo-ovocito); como la compacidad y espesor del revestimiento del cúmulo y el brillo del ooplasma; la granularidad, coloración, inclusión y regiones de agrupación de orgánulos del citoplasma; la forma del cuerpo polar (redondo u ovoide); su tamaño (grande o no); superficie (lisa o rugosa); la integridad (intacto o fragmentado), el grosor y organización de la zona pelúcida, el tamaño (aumentado o no) y la presencia o ausencia de partículas, del espacio perivitelino; las estructuras y características del folículo/ovario (dimensión del folículo; existencia de CL con un folículo dominante o un quiste), y predictores celulares/moleculares.

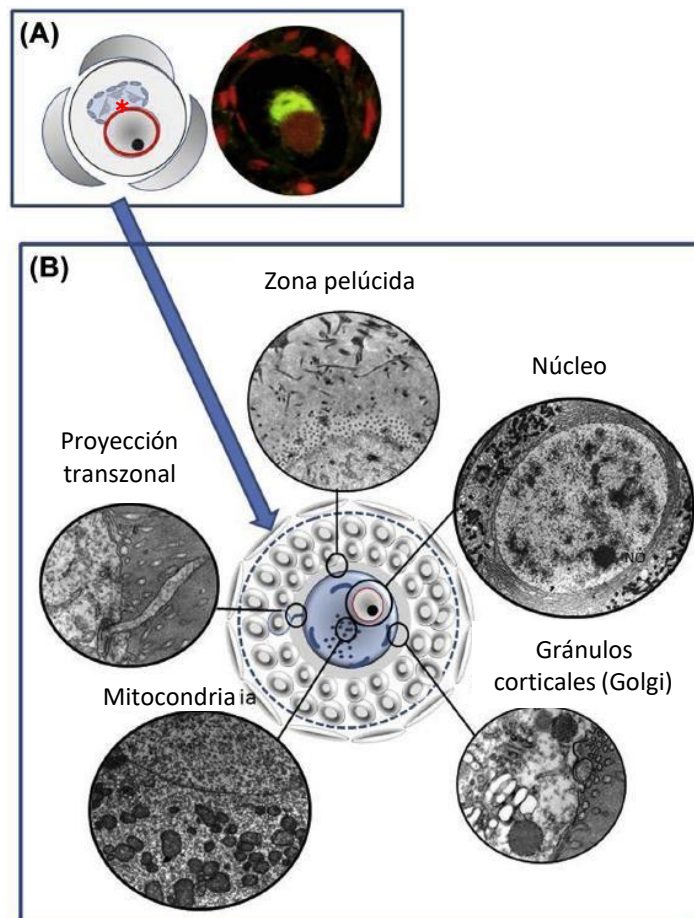
En alpacas, se han utilizado pocos predictores de la calidad del ovocito y aún se requiere más investigación en este campo. La maduración del ovocito, que resulte en un ovocito de calidad (competente) es consecuencia de los mensajes e interacciones hormonales; por lo que el objetivo del presente trabajo es establecer las relaciones entre la presencia y nivel de las hormonas en el folículo ovárico y la calidad del ovocito; para facilitar el desarrollo futuro de formulaciones de medios de maduración *in vitro*, que puedan resultar en ovocitos de calidad.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. EL OVOCITO

Los ovocitos son distintos a otras células del organismo, poseen la capacidad de convertirse, después de la fecundación, en célula totipotente. En las diferentes especies de mamíferos existe variación en el tiempo de desarrollo del ovocito; sin embargo, se conservan los procesos básicos que gobiernan la diferenciación celular, fertilización y embriogénesis (Plant & Zeleznik 2015).

Con respecto a su estructura, estudios de microscopía electrónica han definido en gran medida, la distribución de los orgánulos desde la línea germinal (Figura 1) hasta el desarrollo del embrión (Nicosia *et al.* 1977).



Fuente: Adaptado de Plant & Zeleznik (2015).

Figura 1. Estructura del ovocito

(A) representa la organización general de los orgánulos en un folículo primario. La figura (izquierda) indica el núcleo centralizado y la agregación de orgánulos conocidos como el cuerpo de Balbiani (*). La derecha es una micrografía de inmunofluorescencia de células germinales dentro del cuerpo de Balbiani (verde) ubicado al lado del núcleo del ovocito (rojo). Tras la activación, los ovocitos entran en la fase de crecimiento de la ovogénesis. (B) resume las principales características ultraestructurales de un ovocito en crecimiento dentro de un folículo preantral observando el ensamblaje de la capa extracelular o zona pelúcida, el núcleo agrandado o la vesícula germinal con nucléolos prominentes (NO), complejos de Golgi subcorticales con gránulos corticales asociados, mitocondrias perinuclear y el desarrollo de microvellosidades en la membrana plasmática de los ovocitos que interactúan con las proyecciones de células somáticas conocidas como procesos transzonales.

Para dilucidar los cambios metabólicos de los ovocitos se emplean técnicas *in vitro*, que permiten analizar la síntesis de proteínas y la cinética de progresión del ciclo celular meiótico durante su maduración *in vitro* (IVM); así como, establecer los términos de calidad y competencia ovocitaria (Wassarman & Letourneau 1976).

Estudios en síntesis de ARN, describieron el papel inhibitorio de 3,5-adenosina monofosfato cíclico (cAMP) en el arresto meiótico, descubrimiento que puso los cimientos para el estudio de los mecanismos de control (Cho *et al.* 1974) y la competencia adquirida en la ovogénesis (tabla 1).

Tabla 1. Competencias adquiridas por los ovocitos de mamíferos durante la ovogénesis

Competencia	Etapas adquiridas	Función
Meiótica	Tardío G	reanudación y finalización de la meiosis
Impronta	Tardío G	Metilación de impronta de genes
Fusión de gránulos corticales	M	Bloqueo de la polispermia
Oscilaciones de calcio	M	Activación del cigoto
Pronúcleos del macho	M	Reducción de protaminas; cambio a histonas
Clivaje	PM/M	Capacidad para sostener divisiones de blastómeros

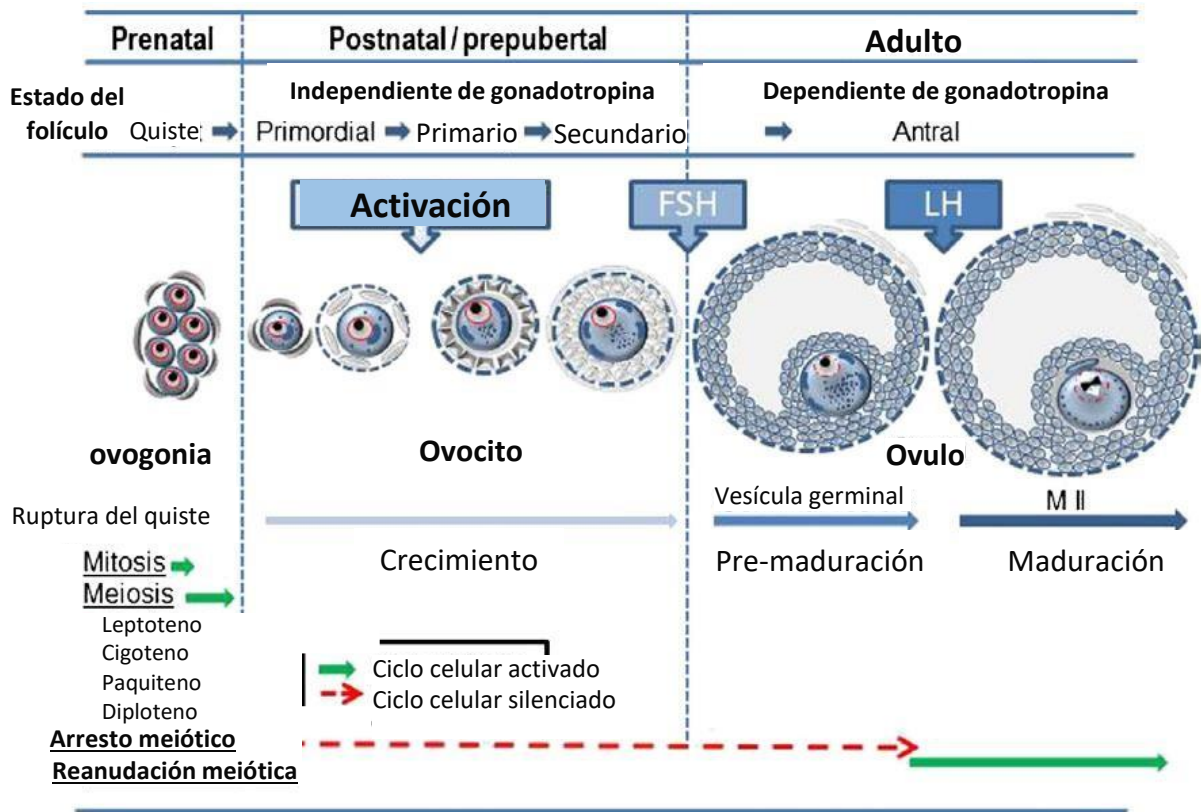
Compactación	PM/M	Capacidad para someter a polarización celular y asignación de linaje
Derivación de células madre embrionarias	G/PM/M	Capacidad para propagar células madre a partir de la masa celular interna
Terminación del parto	G/PM/M	Capacidad para mantener la gestación terminal

Abreviaturas: G, fase de crecimiento; PM, prematuración; M, fase de maduración.

Fuente: Adaptado de Plant & Zeleznik (2015).

Por otra parte, se ha observado el efecto materno de la ovogénesis sobre el desarrollo del embrión al identificarse una gran acumulación de ARN no codificante que probablemente desempeña un papel importante en la fertilización y/o embriogénesis (Li *et al.* 2010).

El proceso de la ovogénesis comienza en el ovario fetal, después de la transición de células germinales primordiales a folículo primordial. Posteriormente, ingresan a la etapa dediploteno en la profase I de la meiosis I y permanecerá en arresto meiótico hasta que la LH produzca la ovulación y reanude la meiosis. La ovogénesis se divide en fase de crecimiento, pre-maduración y maduración (Figura 2). Es importante mencionar que la ovogénesis y la foliculogénesis están integradas. Cada una de las fases está propensa a error nuclear (genético, epigenético) como citoplasmático. Desde el punto de vista del ovocito, la ovogénesis depende de gran medida de señales paracrinas, mientras que, las células somáticas circundantes de las gonadotropinas (Mermillod *et al.* 1999).



Fuente: Adaptado de Plant & Zeleznik (2015).

Figura 2. Etapas de la ovogénesis definida en base al estado del ciclo celular del ovocito.

La proliferación mitótica de la ovogonia ocurre en la gónada prenatal y se acompaña de la entrada a la profase meiótica a medida que se produce la formación del folículo y la ruptura del quiste ovogonico. El ciclo celular se apaga durante la fase de crecimiento de la ovogénesis que ocurre durante las etapas preantrales del desarrollo del folículo. Si bien se requiere FSH para avanzar en el desarrollo del folículo, los ovocitos permanecen en paro meiótico con una vesícula germinal en la etapa de pre-maduración. En respuesta a la oleada de LH, se libera el paro meiótico y el ovocito avanza a través de la maduración ovulada en la metafase dos etapas de la meiosis, que se mantiene hasta que la señal de fertilización provoca la finalización de la meiosis II. En general, la fase de crecimiento de la ovogénesis ocurre independientemente de la estimulación con gonadotropina, mientras que las fases de pre-maduración y maduración requieren estimulación con gonadotropina.

Existe evidencia del papel epigenético en la regulación del proceso de diferenciación del ovocito en la meiosis y en la fase de crecimiento de la ovogénesis. Por ejemplo, en la fase de crecimiento la expresión del factor totipotente Oct4 está modulado por las gonadotropinas a través de alteraciones específicas de sus histonas (Monti *et al.* 2006).

El problema del envejecimiento y los asociados a la pérdida de calidad de ovocitos estaría relacionado a la inestabilidad genética en el ciclo meiótico y mitótico. Evidencias recientes sugieren que el ovocito en sí mismo posee un limitado potencial para rectificar alteraciones heredadas de forma materna y/o paterna. Los posibles vínculos externos como el estilo de vida, contaminación ambiental o daños en el sistema reproductivo no han podido dilucidar la causalidad en la incidencia del mosaísmo en el embrión (Munné *et al.* 1994).

2.1.1. Biología celular del ovocito

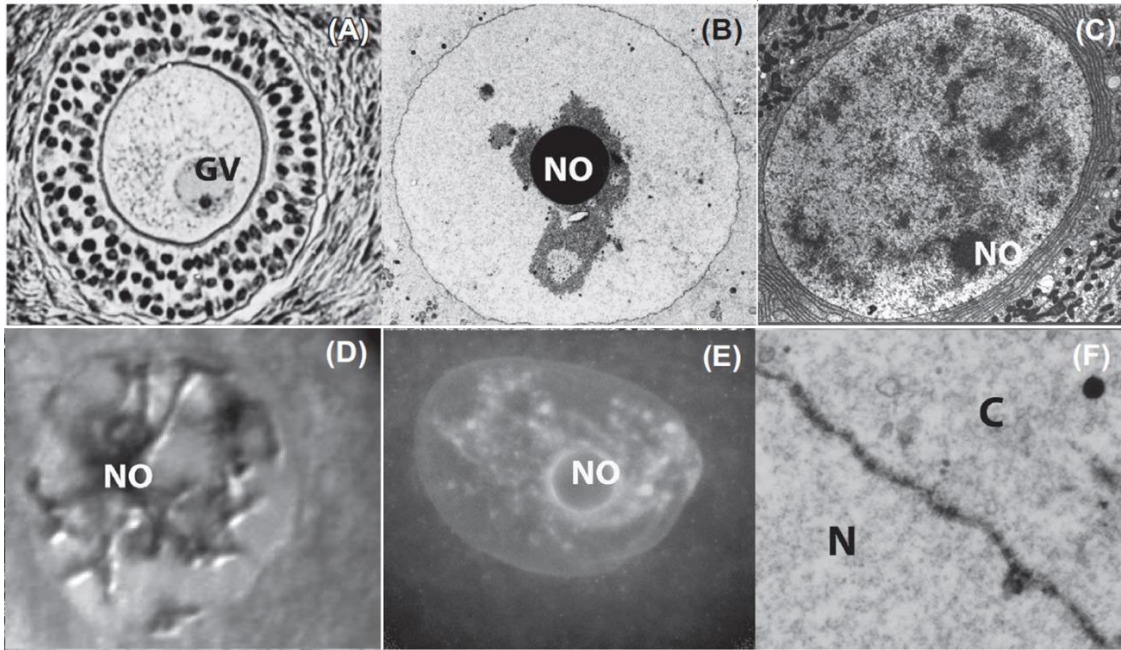
La característica más sobresaliente del ovocito es el tamaño. La transición entre el estado quiescente del folículo primordial a un folículo en crecimiento se realiza por la activación de genes y proteínas de los orgánulos. Los ARN y proteínas sintetizadas en la fase de crecimiento poseen funciones de mantenimiento, regulación del ciclo celular y almacenamiento (Bachvarova 1985).

La fase de desarrollo del ovocito implica requisitos epigenéticos. Se ha observado amplificación de dimetil transferasa en la metilación del ovocito y del embrión (Howell *et al.* 2001). Con el uso de la microscopía electrónica se observó la acumulación y reorganización de los organelos en el desarrollo del ovocito. Las mitocondrias, el complejo de Golgi, los gránulos corticales, entre otros, participan en el proceso de fertilización. Solo los cuerpos de Balbiani se dispersan al activarse el folículo (Parrott & Skinner 1999).

A. La vesícula germinal: un núcleo especializado

La vesícula germinal (GV), está localizada en el centro o en una posición excéntrica del ovocito, contiene prominentes nucléolos que pueden variar en número. La cromatina se muestra de forma condensada (heterocromatina) o difusa (eucromatina), la cual, se cree que posee diferentes niveles de transcripción expresadas en el desarrollo del ovocito (Figura 3). Además, la envoltura nuclear de GV, posee gran cantidad de poros nucleares que median el transporte de ARN en las diferentes fases de crecimiento.

La cromatina compactada alrededor del nucléolo del ovocito se conoce como cariosfera (Parfenov *et al.* 1989). En estudios realizados en ratones, muestran que la encapsulación de la heterocromatina ocurre en el momento de la formación del antro, consistente con la represión transcripcional que ocurre al final de la fase de crecimiento. Estocoincide con la transición de fase G2 a M del ciclo celular (Wickramasinghe *et al.* 1991).



Fuente: Adaptado de Plant & Zeleznik (2015).

Figura 3. El núcleo inmaduro de ovocitos de mamífero o vesícula germinal (GV)

A) ilustra la apariencia general del GV usando histología convencional; en esta sección del ovario del mono rhesus, el GV asume una posición excéntrica y exhibe un nucleolo prominente (NO). (B) es una micrografía electrónica de un GV de ovocito humano que demuestra los límites circulares del núcleo y la presencia de heterocromatina que rodea el nucleolo (NO). En muchos mamíferos, la cromatina fibrilar se puede observar como se muestra aquí para el mono (C) y el bovino (D); en ambos casos los bivalentes están asociados con el núcleo central (NO) y en el aspecto interno de la envoltura nuclear. (E) ilustra la lámina nuclear en un ovocito de ratón con GV que ha sido marcado con anticuerpos contra lamina de tipo B; la cromatina en el ovocito completamente desarrollado se superpone a la señal de lámina tipo B. En (F), una micrografía electrónica de gran aumento de un ovocito humano muestra la alta densidad de poros nucleares en la envoltura nuclear que separa el nucleoplasma (N) del citoplasma (C).

Los factores que regulan la reorganización de la cromatina en la GV se han realizado en estudios en ratones transgénicos. Por ejemplo, el factor de crecimiento y diferenciación 9 (Gdf-9) que es un gen específico para ovocito. Es miembro de la superfamilia de factor de crecimiento transformante beta. Este gen es responsable del desarrollo del folículo pasando la etapa de folículo primario. En ratones que carecen de Gdf-9, los ovocitos sufren hipertrofia, exhiben proliferación de orgánulos deteriorados y muestran represión transcripcional (Carabatsos *et al.* 1998). Delección en el gen de unión Gap-4 (Gja-4) o

conocido también como conexina-37 (Carabatsos *et al.* 2000) y deleciones en el gen FSH-beta (Combelles *et al.* 2004), ambas regulan la capacidad de las células de la granulosa para establecer conexiones con el ovocito. Estos folículos mutantes son detenidos en la etapa preantral, consistentes con la parada de la transcripción.

Se han identificados factores que están involucrados en la reorganización de la cromatina del ovocito, incluyendo genes específicos, genes de contacto celular, gonadotropinas y chaperonas nucleares. Sin embargo, aún falta dilucidar claramente la exacta remodelación de la cromatina y el silenciamiento transcripcional (Comizzoli *et al.* 2011).

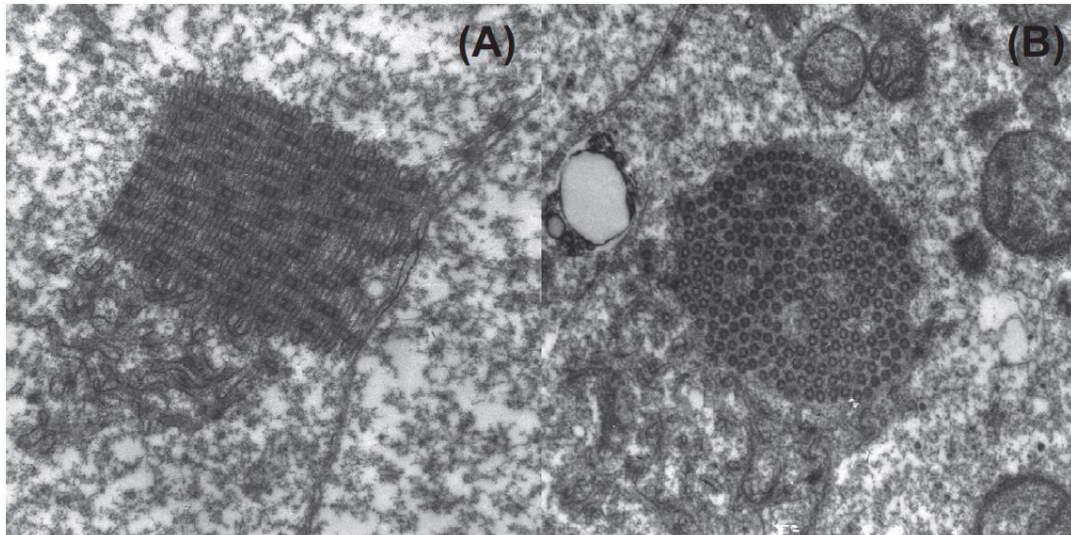
B. Características del citoplasma del ovocito

El citoplasma del ovocito es conocido como ooplasma. Los primeros estudios se centraron en la identificación de los orgánulos y su funcionabilidad en el transcurso del desarrollo de la ovogénesis, como las mitocondrias, retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, las lisosomas, laminillas anulares y el cuerpo de Balbiani (Combelles *et al.* 2001).

La mitocondria contribuye directamente en el metabolismo del embrión y por su parte el genoma mitocondrial provee la herencia a la siguiente generación. En el ovocito primordial, las mitocondrias se encuentran en el perinucleo asociado con el cuerpo de Balbiani. Las mitocondrias en los ovocitos en arresto o en crecimiento poseen relativamente pocas crestas, se cree que es por la reducida actividad metabólica. En ovocitos en crecimiento se observa una amplificación aleatoria de las mitocondrias, además de una marcada polarización.

La expansión y reubicación de las mitocondrias son afectadas también por el sistema Golgi-lisosoma, que tiene como función el control de la biosíntesis de proteínas, de los endosomas y gránulos corticales. Cuando el folículo es activado, el Golgi por sí mismo, posee la función secretora, que incluye, las glicoproteínas para la formación de la zona pelúcida, membrana plasmática y para las proteínas que deben sintetizarse, procesarse e incorporarse en el sistema Golgi-lisosoma (Nicosia *et al.* 1977).

El estudio de las laminillas anulares es poco común (Figura 4). Sin embargo, se cree que la función principal es de reserva de complejo de poros nucleares, las cuales, serán utilizadas después de la fertilización para el ensamblaje de la envoltura nuclear de los blastómeros (Hertig 1968).



Fuente: Adaptado de Plant & Zeleznik (2015).

Figura 4. Aspecto ultraestructural de laminillas anuladas en un ovocito primario de chimpancé visto en la sección transversal (A) y vistas tangenciales (B)

(A) muestra la continuidad de los poros nucleares desde la envoltura nuclear en una pila de láminas anulares. En (B), una sección tangencial a través de la superficie de una pila de laminillas anulares que revela la organización estrechamente compacta de los complejos de poros nucleares.

Otro orgánulo son los centrosomas, se le conoce como el principal centro organizador de los microtubulos (MTOC), participa en la formación del huso meiótico y suministro de apoyo para las divisiones celulares mitóticas en las primeras divisiones del embrión. Los componentes proteicos principales de la MTOC, la gamma tubulina 1 y 2 (TUBG-1 y TUBG-2) y pericentrina. Estas proteínas sufren alteraciones específicas desde la etapa de diploteno en GV hasta la metafase II del ciclo celular. Por esta razón se sugiere que MTOCs un importante indicador materno de la calidad del ovocito y del embrión (Sathananthan *et al.* 2006). Por otro lado, se ha observado producción de centriolos de *novo* en embriones de conejos producidos por activación partenocarpia (Szöllosi & Ozil 1991).

Además de los microtubulos, existen filamentos contráctiles constituidos por proteínas de actina, los asociados a la motilidad como la miosina y los filamentos intermedios que se cree que poseen función de rigidez dentro y entre las células. Los filamentos de actina han sido estudiados en el contexto de la maduración meiótica mediante el posicionamiento del huso meiótico, la polaridad y la extrusión del cuerpo polar. Los filamentos intermedios participan en el complejo de unión necesaria para la compactación y formación del blastocisto. El estudio de estos filamentos nos permite conocer el posicionamiento de los orgánulos, el

ordenamiento de los procesos de señalización en el arresto meiótico como en la reanudación de la meiosis durante la maduración. Existen otras proteínas que poseen funciones específicas en el reordenamiento de los orgánulos, como es el caso de PADI-6 que participa en la disponibilidad de los constituyentes ribosomales asegurando la disponibilidad en los procesos de traducción en el embrión (Esposito *et al.* 2007). En resumen, el papel del citoesqueleto en el mantenimiento y regulación de la organización espacial es requerido para completar el éxito de la ovogénesis y por consiguiente de la embriogénesis.

C. Especializaciones de membrana y capas extracelulares

El citoesqueleto del ovocito ayuda a mantener la forma, el posicionamiento de los orgánulos y la estabilidad del oolema. Sin embargo, en el transcurso de su desarrollo, se genera cambios tanto en tamaño como en volumen.

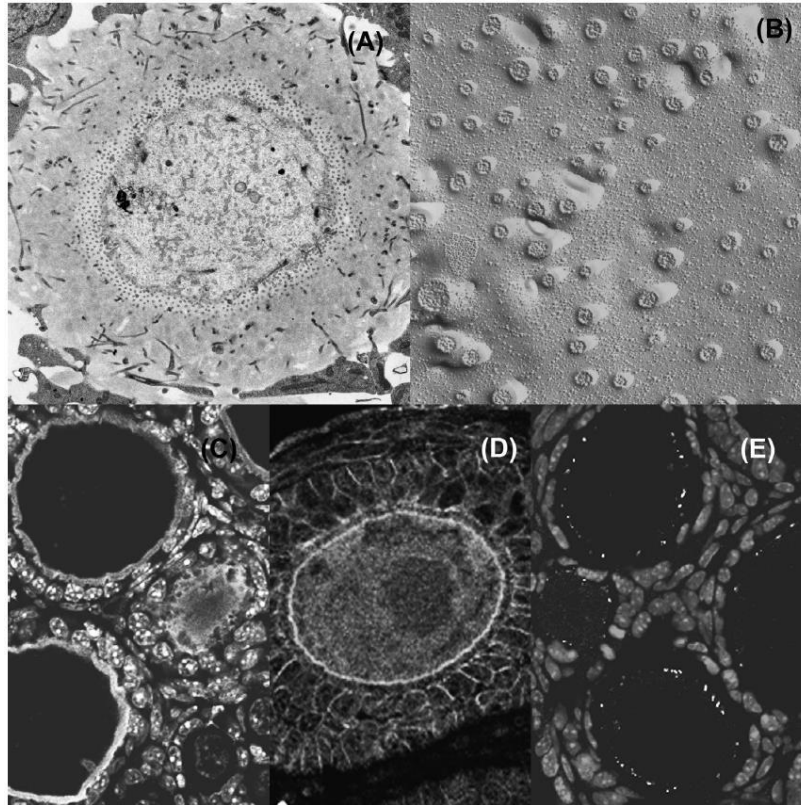
La matriz extracelular más estudiada es la zona pelúcida (ZP). Está constituida por glicoproteínas ZP-1, ZP-2 y ZP-3, las cuales, están sintetizadas, procesadas y secretadas por el ovocito. La función principal de la ZP es de barrera protectora dentro del folículo y después de la liberación en el proceso de ovulación.

En la ZP existen dos proyecciones celulares que se origina en las células de las granulosa de forma externa llamado procesos transzonales (TZP) e interna entre el oolema (Figura 5). En ovocitos en desarrollo, las microvellosidades del oolema permanecen homogéneas hasta la maduración del ovocito.

A medida que el ovocito llega al proceso final de crecimiento, la membrana se va especializando. Esto incluye la acumulación de beta-catenina y la aparición de gránulos secretores en la corteza citoplasmática que genera agrandamiento del ovocito.

Los gránulos corticales junto con la ZP median la interacción entre el espermatozoide y el ovocito en la fertilización. Se conoce que los gránulos corticales acumulan gran cantidad de calcio y se ha observado que poseen la función de bloquear la poliespermia (Ducibella *etal.* 1988). En otros estudios se ha observado el movimiento de los gránulos corticales en dirección del huso meiótico evidenciando los primeros signos de la polarización celular.

En otras modificaciones de la membrana, se ha observado la aparición de bolsas lipídicas ricas en colesterol. Se cree que participan en el proceso de fertilización, así como, en la formación del embrión (Buschiazzo *et al.* 2013).



Fuente: Adaptado de Plant & Zeleznik (2015).

Figura 5. Membranas y capas extracelulares en óvulos de mamíferos

(A) es una micrografía electrónica de una sección tangencial a través de la corteza de un ovocito de ratón; observe la extensión de la zona pelúcida y la penetración de numerosas TZP. (B) es una micrografía electrónica de fractura por congelación a través del oolemma de un ovocito de conejo que muestra las bases escindidas de las microvellosidades y una unión gap solitaria. C, D y E ilustran la disposición de ZP3 (C), beta-catenina (D) y CXN 37 (E) detectados inmunocitoquímicamente en secciones de ovario de ratón adulto.

2.1.2. La fase de crecimiento de la ovogénesis

A. Patrones de expresión génica

El control de regulación de los patrones de expresión génica nos permite dilucidar la integración que existe entre folículo y ovocito, asegurando las competencias que debe adquirir el ovocito en espacio y tiempo desde la iniciación hasta el desarrollo embrionario.

Los avances en la era genómica y el desarrollo de nuevas estrategias como la ingeniería genética han impulsado el descubrimiento de redes génicas en las primeras etapas de la ovogénesis; identificando, caracterizando y conociendo las funciones de genes específicos (Pangas & Rajkovic 2006).

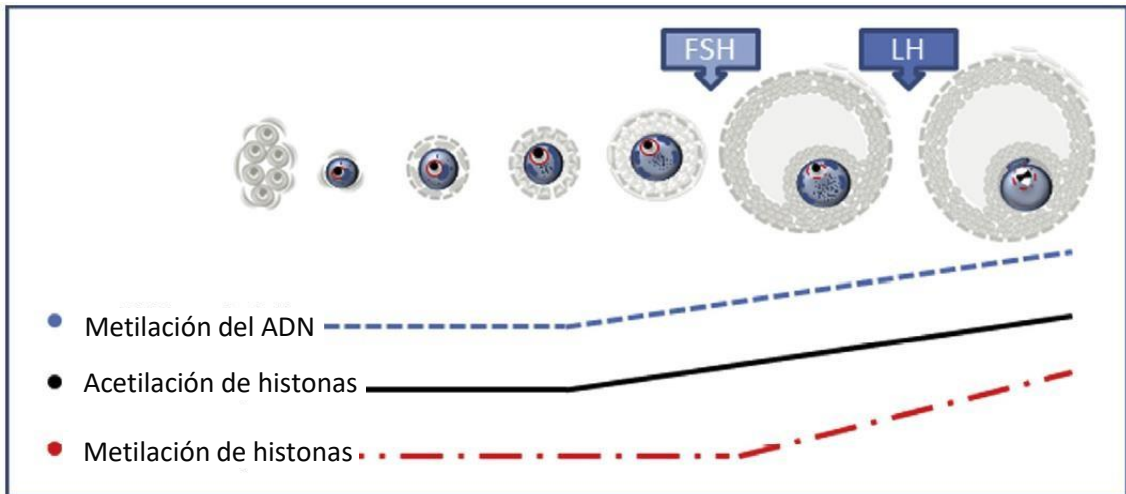
Uno de los genes más estudiados en el principio de la foliculogénesis es el Nobox, que codifica la proteína homeobox de ovario de recién nacido. Es un regulador central del ensamblaje folicular y de genes involucrados en la línea germinal materna. El gen Nobox es un factor de transcripción que regula promotores de los genes Gdf-9 y Pouf-51. Otros factores de transcripción involucrados en la diferenciación del ovocito son Sohlh-1, Sohlh-2 y Lhx-8 (Pangas & Rajkovic 2006).

Los genes involucrados en la foliculogénesis primaria específicos de ovocito son Bmp-15 y el Gdf-9. Se ha observado en knockout Gdf-9, el bloqueo temprano de la etapa folicular primaria y crecimiento aberrante del folículo. Por su parte, knockout del gen Bmp-15, evita que el folículo primario pase a la etapa de folículo secundario.

En estudios transcriptómicos de una sola célula realizados a ovocitos pre-antrales y antrales se observó la expresión de genes como Nobox, Oct-4, Bmp-15, Gdf-9, Oogenesis-1 y Oogenesis-2. Estos genes estarían involucrados en el desarrollo del ovocito a la etapa antral. Puesto que, al final de la fase de crecimiento (etapa de metafase II), la expresión de estos genes disminuye, obteniendo valores similares a la etapa de ovocito primordial (Monti & Redi 2009).

Los estudios en la regulación génica del ovocito en la etapa de crecimiento, pre-maduración y maduración en la ovogénesis, y los posteriores eventos de fertilización y embriogénesis son temas de discusión académica. Entender los procesos de transcripción, traducción y las modificaciones postraduccionales, así como, su eminente degradación en espacio y tiempo revela la complejidad de la regulación génica. La adición de agentes exógenos como las gonadotropinas y los estudios *in vitro* modifican completamente los patrones de expresión. Sin embargo, estos estudios nos permiten dilucidar los patrones de calidad del ovocito y del embrión (Paczkowski *et al.* 2011).

Uno de los métodos celulares usados en la regulación génica es la metilación de promotores específicos de genes. Este papel es asumido por la familia de dimetiltransferasas. En estudios recientes realizados en ratones, se ha observado patrones de desmetilación y remetilación (Figura 6). La metiltransferasa es responsable de la metilación de citosina en el genoma del ovocito y se han descrito tres tipos Dnmt3a, Dnmt3b y Dnmt3L, se expresan en patrones temporales durante la fase de crecimiento de la ovogénesis. Adicionalmente, se ha descrito Dnmt1o, participa en la remetilación de genes cigóticos (Cirio *et al.* 2008).



Fuente: Adaptado de Plant & Zeleznik (2015).

Figura 6. Modificaciones epigenéticas de la cromatina durante la ovogénesis

Los genes presentes en modificaciones epigenéticas muestran signos progresivos de metilación del ADN que comienzan durante la fase de crecimiento de la ovogénesis y terminan en algún punto del folículo preovulatorio. La acetilación de histonas en los ovocitos en desarrollo sigue un curso de tiempo similar al de la metilación del ADN, mientras que se informa que la metilación de histonas ocurre después de la fase de crecimiento. Los datos se basan principalmente en estudios en el ratón.

Los estudios de genes de efecto materno están en constante descubrimiento (Tabla 2). Se sabe que, desempeñan función después de la fertilización en procesos genéticos y epigenético y son usados como marcadores de calidad embrionaria. En esta categoría tenemos a genes como *Tubg-1*, *Stella*, *BRG-1*, *Basonuclina* (Ma *et al.* 2006). En estudios recientes sobre *Ring-1* y *Rnf-2*, se demostró la participación en el complejo Polycomb- repressivo 1 (PRC-1), posee función de remodelación de la cromatina en la ovogénesis y embriogénesis (Posfai *et al.* 2012).

Finalmente, para añadir un nivel de complejidad al estudio de la expresión génica en el ovocito, se debe mencionar el descubrimiento de siRNA, miARN y lncARN, muchos de cuales participan en las regulaciones postranscripcionales de los ARNm (Luense *et al.* 2009). El entendimiento de los mecanismos que subyacen en la expresión génica apenas se está dilucidando.

Tabla 2. Genes de efectos maternos identificados en ovocitos de mamíferos

Nombre	Función de la proteína	Defecto embrionario
Mater (NLRP5)	Potenciador de la transcripción	Bloqueo de 2 células
Tle6	Potenciador de la transcripción	Bloqueo de 2 células
Zar1	Desconocido	Bloqueo de 1 célula
Padi6	Peptidil arginina deiminasa	Bloqueo de 2 células
Filia	Desconocido	Retraso del ciclo celular
Floped (Ooep)	Desconocido	Retraso del ciclo celular; clivaje anormal
Tubg1	Nucleación de microtúbulos	Bloqueo del blastocisto
Dnmt1o	DNA metiltransferasa 1	Bloqueo de la compactación
Stella (Dppa3)	Mantenimiento de la metilación	Bloqueo de la compactación
Npm2	Nucleoplasmina 2 (remodelación de la cromatina)	Bloqueo de 2 células
Ring1, Rnf2	Represión transcripcional	Bloqueo de 2 células
Spindlin	Desconocido	ZGA
BRG1	Desconocido	ZGA
Basonuclin	Organizador nucleolar	Bloqueo de 2 células
TBP-2	Proteína de unión a TATA	Desconocido

Abreviaturas: MATER, antígeno materno que requieren los embriones; DNMT1O, isoforma específica de ovocitos de dimetil transferasa; ZGA, activación del gen cigótico.

Fuente: Adaptado de Plant & Zeleznik (2015).

B. Regulación de la síntesis de proteínas

Los productos de la traducción siguen patrones temporales al igual que los ARN. Sin embargo, el estudio de las proteínas es más compleja que los ARN. Participan en todo el proceso de señalización, en la formación de estructuras como el citoesqueleto o en la formación de entidades macromoleculares como los orgánulos, así como, en otras funciones esenciales (Bachvarova *et al.* 1981).

Las proteínas más estudiadas en la ovogénesis son las involucradas en la regulación del ciclo celular. Para dilucidar el papel que cumplen, se han realizados estudios en condiciones *in*

in vitro como la estabilidad meiótica, fusión de gránulos corticales, y sobre la competencia embrionaria (Bultman *et al.* 2006).

Una de las primeras proteínas estudiadas en el mecanismo de regulación translacionales la ciclina B. participa en la regulación que impulsa la progresión de la fase G2 a la M del ciclo celular. Actualmente, se sabe que el ARNm de la ciclina B requiere modificaciones en la región no traducida 3', ya que, controla la interacción al elemento de unión de poliadenilación citoplasmática (CPEB) que al ser fosforilada coordina el inicio de la traducción (Tay *et al.* 2000).

Muchos de los ARNm que son utilizados en la transición de fases son sintetizados y almacenados anticipadamente. Sin embargo, se ha observado síntesis de genes de *novo* y por consiguiente síntesis de proteínas de *novo* que participan en la descomposición de la vesícula germinal (GVBD) muchos de los cuales basados en la actividad kinasa y fosfatasa (Léavesque & Sirard 1995).

Con los nuevos estudios transcriptómicos y proteómicos, se descubrirán nuevos niveles de complejidad en el control de la traducción de proteínas en el proceso de la ovogénesis. A su vez, permitirá conocer las condiciones para el uso en cultivo *in vitro*, como también, la etiología del envejecimiento y aneuploidía del ovocito (Mortensen *et al.* 2011).

C. Modificaciones postraduccionales de proteínas

Las modificaciones postraduccionales de proteínas (PTM) en ovocito, se han enfocado en estudios de las alteraciones de la función de las proteínas en la transición del ciclo celular. Sin embargo, estos estudios siguen siendo descriptivos, es decir, basados en el uso mediante detección por anticuerpos específicos. Muchos de estos anticuerpos varían en sensibilidad y especificidad, por lo que generalmente se utilizan para realizar cambios en la localización de la proteína diana.

D. Modulación epigenética del genoma

En el campo de la epigenética, los estudios en el cambio expresión genética no se basan en las alteraciones de la secuencia de nucleótidos del gen. Por lo que, los estudios se basan en la acumulación de enzimas involucradas en la metilación de promotores genéticos durante el proceso de la ovogénesis. Con el estudio de la comprensión de la epigenética se pudo obtener fetos de ratones completamente partenogénicos (Kono *et al.* 2002). Claramente, la

epigenética es un campo importante para el estudio de la biología del ovocito. Actualmente, con el descubrimiento de las enzimas Tet-3 de línea germinal materna, que posee la función de hidroxilación del 5-metilcisteína genera la reprogramación del genoma en el ovocito y posterior fertilización (Gu *et al.* 2011).

E. Coordinación de la ovogénesis con la foliculogénesis

La ovogénesis y la foliculogénesis se integran mediante la comunicación entre células dentro del folículo. La comunicación se da por rutas de señalización mediante comunicación directa vía unión gap hasta mecanismos de retroalimentación paracrina donde está implicado los factores de crecimiento.

La activación de rutas de señalización en las células de la granulosa (GC) como en el ovocito alteran la expresión génica, el estado del ciclo celular y por consiguiente la supervivencia. Se sabe que, los ovocitos influyen en la proliferación de GC, aumenta la expansión del cumulo inducido por el FSH, suprime la expresión del receptor de LH, mantiene la cooperación metabólica y modula la activación del mitógeno de la protein kinasa de las células del cumulo (ERK1/2) (Su *et al.* 2003).

La estabilidad de ovocito dentro del folículo está dada por la acumulación de la matriz de hialuronato (Canipari *et al.* 1995). Las GC son de dos tipos. Aquellos que están en contacto con el ovocito llamado cúmulos y los que están en la frontera del folículo. Estos últimos son precursores de las células luteales que producirán progesterona después de la ovulación. Por su parte, las células de los cúmulos generan el soporte metabólico durante el crecimiento y maduración del ovocito.

La modulación del transporte de calcio afecta la supervivencia del ovocito a través de la caspasa-2. Otros factores secretados por el ovocito que participa en el desarrollo folicular son GDF-9 y BMP-15 (Hussein *et al.* 2006). Por su parte. La adquisición de la competencia meiótica está estrictamente ligada con el tamaño del ovocito (Hirao *et al.* 1993). Se debe tomar en cuenta que un exceso en gonadotropinas inhibe o retrasa la adquisición de la competencia meiótica por deficiencia en la cooperación metabólica.

El evento de señalización provocada por el aumento de la LH, se inicia por la producción de *novoo* del factor de crecimiento epidérmico (EGF) por parte de la GC provocando el cierre selectivo de uniones Gap como resultado de la fosforilación de conexina-37 por las MAP-kinasa. Tanto, la modulación del monofosfato de guanosina cíclica (GMPc) y EGF apoya el

inicio y el mantenimiento de la progresión meiótica (Hsieh *et al.* 2011).

2.1.3. Fase de maduración de la ovogénesis

Para plantear el escenario de la maduración del ovocito primero se debe adquirir toda la maquinaria molecular para la transición de la etapa G2 a M. Segundo, producción y almacenamiento de transcritos para su uso después de la fertilización. Tercero, crecimiento de la GV.

La regulación de la fase de maduración dura desde horas a días. La maquinaria molecular está regulada en espacio y tiempo. El control de la regulación de la maduración del ovocito es importante para la fertilización y embriogénesis hasta que se activen los genes cigóticos.

La transición de la meiosis a la mitosis requiere poseer el uso meiótico intacto en la metafase II, solo así, se activará la maquinaria de degradación de la ciclina B. Este estudio demuestra el papel espacio-temporal del citoesqueleto en la maduración del ovocito (Kitajima *et al.* 2011). Los estudios de maduración *in vitro* nos permiten dilucidar y comprender de una forma indirecta los mecanismos que subyacen la maduración del ovocito *in situ*.

A. Huso meiótico

El huso meiótico es una de las estructuras principales en la segregación de los cromosomas en el anafase de la meiosis I y II. El huso está anclado a la corteza del ovocito desde donde se despliega las proteínas del centrosoma hacia los polos del huso.

Los cambios en los medios de cultivo *in vitro* impactan en la morfogénesis del huso, sin embargo, se tiene tasa de progresión meiótica y de eficiencia normal. Se cree que los suplementos como factores de crecimiento poseen un efecto sobre la competencia de desarrollo embrionario. Defectos en la organización de huso han sido asociados con la aneuploidía. Actualmente, se utiliza agentes químicos como la fosfodiesterasa en la sincronización del ovocito para mantenerse en fase G2 (Nogueira *et al.* 2006).

B. Corteza del ovocito

La corteza del ovocito juega un papel importante en la citocinesis. La asimetría de la citocinesis asegura la extrusión de los cuerpos polares. La extrusión del ovocito cumple dos funciones vitales en la maduración del ovocito. Primero, la restricción espacial de las fuerzas contráctiles para la formación de ambos cuerpos polares garantice la segregación de

subproductos cromosómicos en el anafase I y II. Esto garantiza la expulsión de los cuerpos polares. Segundo, el pequeño tamaño de los cuerpos polares garantiza la retención de la mayoría de los componentes moleculares y orgánulos que serán destinados al consumo y utilización del cigoto (Longo 1987).

En estudios en ratones, se cree que la kinasa FYN inhibe la reorganización de huso y de la citocinesis (McGinnis *et al.* 2009). Otro estudio sugiere que la proteína tirosina kinasa participa en mecanismos de motilidad del citoesqueleto de actina. Se sabe que, el citoesqueleto de actina y beta catenina se separa de la corteza del ovocito en la embriogénesis (Mcginnis *et al.* 2011).

El modulador del citoesqueleto de actina es el calcio y su acumulación en el retículo endoplásmico como en otros orgánulos posee un impacto a largo plazo en la calidad del ovocito. Se ha documentado el papel del ion zinc en la progresión del ciclo celular meiótico probablemente juega un papel importante en la regulación del citoesqueleto del ovocito (Bernhardt *et al.* 2011).

En los ovocitos enucleados preparados para la transferencia nuclear de células somáticas el centro organizador de microtubulos es detenido. Esto asegura la herencia de los centrosomas maternos en los embriones reconstruidos. Este suceso genera la unión de centrosomas del núcleo somático donador y del ovocito enucleado. Los citoesqueletos basados en actina y los basados en tubulinas impulsan la fase madurativa y las interacciones entre estos componentes parecen estar unidas a la familia de las forminas (Verlhac & Breuer 2013).

2.2. MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS

Los ovocitos de mamíferos dependen del ambiente folicular para una maduración adecuada. Los ovocitos y los folículos tienen interrelaciones similares a la simbiosis. El folículo pierde su competencia cuando se produce la ovulación (Hatırmaz *et al.* 2018).

El desarrollo folicular como la reanudación meiótica es influenciada por el medio folicular al ser alterado por el pico de LH, iniciando la maduración del ovocito. Se sabe que, la condensación de la cromatina se inicia en el paso del folículo preantral a antral. Además, el factor de diferenciación del crecimiento (GDF-9) y la proteína morfogenética ósea (BMP-15) secretada por el ovocito posee funciones de regulación de proliferación de GC, por lo que, el ovocito dirige su propia maduración nuclear y citoplasmática mediante comunicación con las GC (Otsuka *et al.* 2011).

En los medios de maduración *in vitro* (IVM) se sugiere incluir la utilización del fluido folicular, análogos de la LH y la FSH al medio de cultivo (Ge *et al.* 2008). Se cree que estas adiciones influyen directamente en la maduración nuclear pero no en la maduración citoplasmática. En otros estudios, se sugiere añadir albumina sérica a los medios de cultivo. Actualmente, imitar un medio de cultivo en entorno folicular es la mejor manera de conseguir un IVM estándar. Se debe tomar en cuenta que los medios de cultivo varían de concentración y de metabolitos de una especie a otra (Ali *et al.* 2006).

En estudios morfológicos de los ovocitos se han registrado dos tipos de GV; los que están rodeando por el nucléolo (SN) y los que no están rodeados por el nucléolo (NSN). Se ha demostrado que SNGV que posee heterocromatina rodeando el núcleo posee mayor competencia en la maduración del ovocito que los NSNGV (Monti *et al.* 2017).

El medio de cultivo base más utilizado es TCM-199 pero no es suficiente para una maduración eficaz. Suplementos adicionales son los factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), activina y los cocultivos con GC (Lin *et al.* 2009).

Los suplementos de los IVM han favorecido la maduración nuclear, sin embargo, la maduración del citoplasma ha obtenido resultados desfavorables. En IVM se ha observado errores en la alineación de los cromosomas y de la estructura de huso meiótico. Por otro lado, en estudios de los componentes de materiales de plásticos utilizados en IVM como el bisfenol-A, se cree que posee un efecto desfavorable en la formación de la metafase II y sobre el aumento de la tasa de degeneración de ovocitos (Machtinger *et al.* 2013).

2.2.1. Cambios estructurales del ovocito en IVM

En estudios sobre la activación de la meiosis mediada por esterol (MAS), se demostró la influencia positiva sobre la morfogénesis del ovocito y la maduración nuclear. Los suplementos de medio de cultivo como el forskolin un activador del adenilato ciclasa y cilostamida un inhibidor específico de inhibidores de fosfodiesterasa influyen en la maduración y en la reanudación meiótica (Shu *et al.* 2008).

En el estado de ruptura de la vesícula germinal (GVBD), las microvellosidades que rodean el ovocito en metafase I son muy comunes y de gran tamaño. En metafase II, se ha observado mayor apoptosis y reducción en las crestas mitocondriales junto con una mayor actividad de

apoptosis en GC (Yang *et al.* 2009).

En estudios de microscopia electrónica en metafase II, se reveló ciertas características morfológicas como zona pelúcida fibrilar y densa, espacio perivitelino uniforme, oolema continuo y microvellosidades distribuidas uniformemente. En estudios de distribución mitocondrial se observaron tres tipos de patrones; periférico, semiperiférico y uniformemente difuso. Los ovocitos en la pre-IVM obtuvieron patrones de distribución periférica y los post-IVM patrones de uniformemente difuso. En los ovocitos maduros *in vivo* mostraron distribución central. Por otro lado, se ha observado que la melatonina estaría influenciando positivamente en la maduración nuclear del ovocito (Shahedi *et al.* 2013).

En ovocitos maduros utilizando IVM, fertilizados e implantados *in vivo*, mostraron disminución significativa de los ARNm a comparación de ovocitos madurados *in vivo*. Específicamente, se observó una disminución de los ARNm de implantación, generando la pérdida del embarazo (Coticchio *et al.* 2015).

2.3. FLUIDO FOLICULAR Y CALIDAD DEL OVOCITO

La evaluación de la calidad de los ovocitos se está convirtiendo en el objetivo principal de la embriología utilizando FIV. Puesto que, los estudios de FIV clásica no incluían la evaluación de la calidad de los ovocitos. La predicción de la calidad de los ovocitos está dada por los análisis morfológicos, análisis de genes marcadores tanto en el ovocito como en las células de la granulosa, y de los análisis de defectos cromosómicos suscitados en el ovocito (Dawson *et al.* 2006).

El fluido folicular (FF) del folículo está constituido por constituyentes de plasma sanguíneo y compuestos secretados por las células de la granulosa y la teca. Es razonable pensar que las características bioquímicas del FF estén influenciando en la calidad del ovocito (Fortune 1994).

Para realizar estudios en el FF, sus componentes se han agrupado en: Hormonas, Factores de crecimiento, interleucinas, especies reactivas de oxígeno (ROS), factores antiapoptóticos, proteínas, péptidos y aminoácidos, azúcares y prostanoïdes (Revelli *et al.* 2009).

2.3.1. Hormonas

A. Gonadotropinas

La concentración de gonadotropinas FSH y LH en el FF se ve afectada por la secreción hipofisaria. Sin embargo, en FIV los niveles de gonadotropina son constantes. Se ha informado que concentraciones altas de FSH, CG y LH, promueven la maduración del ovocito y está asociada a una alta tasa de fertilización (Enien *et al.* 1998).

Las gonadotropinas influyen en la secreción de ácido hialurónico por las GC, sobre el estradiol (E2) para mejorar la maduración citoplasmática del ovocito y sobre la secreción del AMPc que está involucrado en el control de la meiosis del ovocito (Mendoza *et al.* 2002).

B. Hormona de crecimiento

Se sabe que la hormona de crecimiento (GH) y la FSH actúan sinérgicamente en la producción de E2. Así como la formación de receptores de FSH y LH en las GC. Se ha documentado que en folículos con mayor concentración de GH generaron mayor tasa de embriones (Izadyar *et al.* 1999).

C. Prolactina

En algunos estudios se informaron sobre el vínculo entre la prolactina (PRL) y el AMPc. En el FF, se ha observado un aumento en PRL y una disminución en AMPc que se correlaciona con una tasa alta de fertilización. Sin embargo, la PRL no se considera un marcador confiable de la calidad ovocitaria (Rosenbusch *et al.* 1992).

D. Estrógeno, progesterona y andrógenos

Es conocido que un medio estrogénico intrafolicular posee un efecto positivo sobre el crecimiento folicular, además, posee un efecto antiatresico. E2 está relacionado directamente con la maduración citoplasmática por medio de la regulación de la entrada de Ca^{2+} (Tesarik & Mendoza 1997).

La elevada concentración de E2 y del ratio E2/progesterona (P4) en FF, indica etapas avanzadas de maduración ovocitaria. Sin embargo, existen estudios que relacionan el bajo ratio E2/P4 con un mayor porcentaje de implantación y de embarazo, aunque, se debe considerar otros factores como la actividad luteína y la reducción de la actividad aromatasa

al final de la maduración del ovocito. En otro estudio se ha observado que concentraciones altas de P4 en FF está asociada a ovocitos postmaduros que genera fertilización anómala (Ben-Rafael *et al.* 1987).

Los niveles elevados de testosterona (T4) se relaciona con una baja calidad ovocitaria y baja tasa de división después de la fertilización. La relación E2/T4 es alta en FF asociado al embarazo. Por su parte, el bajo ratio Estrógeno/andrógenos es asociado a atresia folicular temprana (Lisi *et al.* 2002).

E. Corticoides

Los corticoides en el FF son importantes para lograr la maduración final del ovocito y posterior implantación de los embriones. Un alto nivel de cortisol/cortisona en FF es asociado a mayor tasa de embarazo realizado en FIV. Se han asociado los corticoides con aumento en la respuesta ovárica y maduración del ovocito. Sin embargo, estos estudios no son concluyentes (Revelli *et al.* 2008).

2.3.2. Factores de crecimiento de la superfamilia de factores de crecimiento transformante beta (TGF- β)

A. Inhibina y activina

Las GC producen inhibina. En el FF, la inhibina A aumenta, mientras que la inhibina B disminuye durante la fase folicular. La inhibina se considera un marcador de respuesta ovárica, pero no de la calidad del ovocito o del embrión. Sin embargo, existen estudios que relacionan a la inhibina B del FF con la eficacia de crecimiento folicular. Otro estudio encontró que altos niveles de inhibina A y B están asociados con un aumento de la fertilización y embarazo (Chang *et al.* 2002).

La alta concentración de la activina A en el FF se correlaciona positivamente con la calidad del ovocito. Cabe mencionar que el papel de la activina A como marcador de la calidad del ovocito y su relación con la inhibina necesita más investigación (Lau *et al.* 1999).

B. Hormona antimülleriana

La hormona antimülleriana (AMH) es una glicoproteína con funciones relacionadas con el crecimiento y la diferenciación celular (Melado 2014). En humanos, la AMH se sintetiza como un gran precursor de 560 aminoácidos, con una secuencia de señal corta de 18

aminoácidos, seguida de la pre-prohormona que forma homodímeros. Antes de su secreción, la hormona madura es glicosilada y dimerizada para dar un dímero de 144 kDa compuesto por dos subunidades idénticas monoméricas de 72kDa, ligadas por puentes disulfuro (Josso *et al.* 1990). En circulación podemos encontrar una mezcla de la pro-AMH, del complejo C-terminal y N-terminal (Capecce *et al.* 2016).

A diferencia de otros miembros de la superfamilia de TGF- β , se considera que la AMH necesita el dominio N-terminal para potenciar la actividad del dominio C-terminal y alcanzar su completa bioactividad, causa la regresión del conducto de Müller e inhibe la síntesis de aromataza en el ovario fetal (Wilson *et al.* 1993).

Entre el 5 y el 20% de AMH se fragmenta en un punto específico entre los dominios N-terminal y C-terminal del monómero de 72 kDa, durante el paso citoplasmático, para formar dos polipéptidos de 58 kDa (región pro) y 12 kDa (región madura), que siguen unidos por uniones no covalentes.

Los miembros de la familia TGF- β tienen sus efectos a través de dos tipos de receptores serinotreonin-kinasa, denominados tipo I y tipo II, y de dos efectores citoplasmáticos “Smads” regulados por receptores (R-Smad) y Smad comunes (Smad4). El receptor primario, tipo II, se une al ligando y fosforila al receptor tipo I. Una vez activado, este último fosforila el R-Smad, que interactúa con el Smad4. Este complejo es posteriormente transportado al núcleo donde se une a un elemento de unión al Smad (SBE), en el promotor de la diana o en los genes (Massagué & Chen 2000).

El mensajero del AMHR-II se expresa de forma específica por los órganos diana de la AMH, como los conductos de Müller y las gónadas de ambos sexos. Los estudios de hibridación *in situ* han demostrado que, en los conductos de Müller, el ARNm del AMHR- II se expresa en las células mesenquimales que rodean el epitelio y desaparece en el varón tras la regresión de los conductos de Müller. En el ovario, el AMHR-II se expresa desde la vida fetal hasta la etapa adulta en las células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales. En el testículo, se expresa desde el periodo fetal hasta la pubertad (Baarends *et al.* 1995).

En el embrión de los mamíferos, ambos sexos son inicialmente indistinguibles. El sistema reproductor del embrión masculino y femenino consiste en una gónada indiferenciada y dos conductos, los de Wolff y los de Müller, precursores de los tractos reproductores masculinos (epidídimo, conductos deferentes y vesículas seminales) y femeninos (trompas de Falopio, útero y parte superior de la vagina), respectivamente. Por tanto, el embrión es inicialmente

indiferenciado, y el correcto desarrollo sexual depende de la producción y respuesta a las hormonas testiculares. En el embrión masculino, la AMH, producida por las células de Sertoli, de los testículos embrionarios en diferenciación, provoca la pérdida del conducto de Müller, y la testosterona producida por las células de Leydig estimula el desarrollo de los conductos de Wolf (Behringer *et al.* 1994).

Durante la diferenciación sexual femenina la AMH no se expresa en el ovario. La AMH se expresa por primera vez en las células de la granulosa de los folículos primordiales reclutados, encontrados por primera vez en ovarios de ratas el día 3° o 4° de vida postnatal, y en el feto humano a partir de la 36 semana de gestación. La AMH continúa expresándose en los folículos en crecimiento del ovario hasta que han alcanzado el tamaño y estadio de diferenciación, en el que serán seleccionados para llegar a ser dominantes mediante la acción de la hormona estimulante de los folículos (FSH) hipofisaria. Por tanto, la AMH se expresa en los folículos reclutados del pool de folículos primordiales que no han sido seleccionados para la dominancia. Antes y después de estos dos importantes puntos de regulación en el ovario, la AMH no se expresa (Meys *et al.* 1999).

Los efectos inhibitorios de la AMH en la sensibilidad a FSH de los folículos podrían jugar un papel importante en el proceso de selección (Figura 7). En ausencia de AMH, los folículos primordiales son reclutados a un ritmo más rápido, lo que resulta en un agotamiento del pool de folículos primordiales (Durlinger *et al.* 2001).

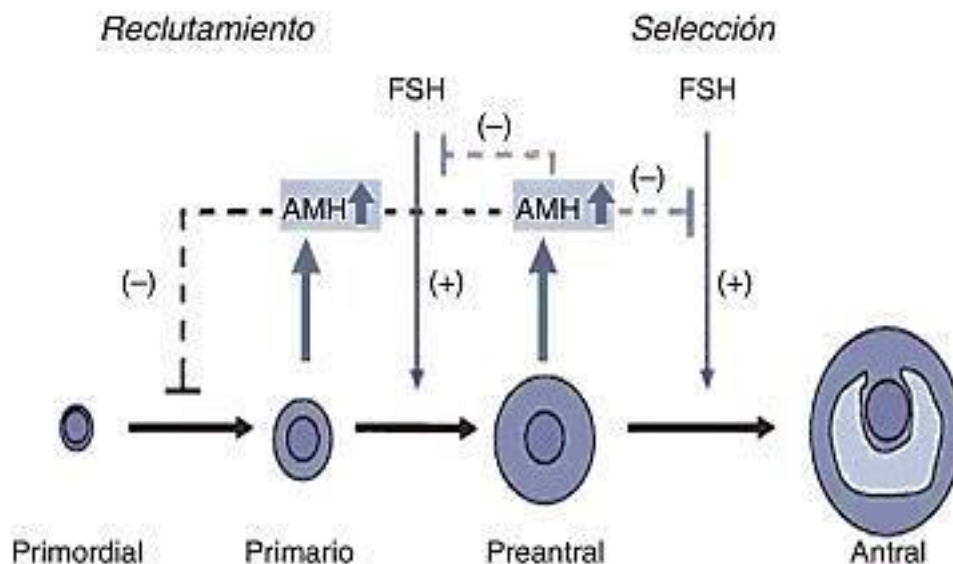


Figura 7. Sitios de unión de la AMH en la foliculogénesis

La relación de la AMH y la calidad del ovocito es contradictoria. Es decir, existen estudios que avalan la relación positiva de AMH y la calidad del ovocito, como estudios donde existe

una correlación inversa entre AMH y la calidad del ovocito. Sin embargo, se ha observado mayor concentración de AMH en ovocitos maduros y se ha correlacionado con mayor tasa de fertilización (Takahashi *et al.* 2008).

C. Proteína morfogenética ósea 15

La proteína morfogenética ósea 15 (BMP-15) influye directamente en la maduración y calidad del ovocito. Se observaron niveles altos de la BMP-15 en el FF en los ovocitos maduros, obteniendo mayor tasa de fertilización. También, se ha observado una correlación positiva entre BMP-15 y el estradiol. Sin embargo, aún se requieren más estudios para confirmar este resultado (Wu *et al.* 2007).

2.3.3. Otros factores de crecimiento e interleucinas

Se han reportado otros factores de crecimientos e interleucinas que se relacionan con la tasa de maduración, fertilidad y desarrollo embrionario; como son los factores de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I y IGF-II), y las proteínas de unión a IGF (Asimakopoulos *et al.* 2008; Revelli *et al.* 2009), el factor de crecimiento anfiregulina (Inoue *et al.* 2009), factor de necrosis tumoral alfa, factor de crecimiento de fibroblasto básico (Asimakopoulos *et al.* 2008), interleucina-1 beta (Mendoza *et al.* 1999), interleucina-2 e interferón gamma (Lédée *et al.* 2008), leucotrienos B4 (Bili *et al.* 1998).

2.3.4. Especies reactivas de oxígeno

El estudio de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los antioxidantes se han correlacionado con la calidad del ovocito (Agarwal *et al.* 2003; Hu *et al.* 2001; Pasqualotto *et al.* 2004; Paszkowski *et al.* 1995; Tamura *et al.* 2008; Van Blerkom *et al.* 1997). Al igual que el óxido nítrico (Lee *et al.* 2004; Manau *et al.* 2000) y el factor de crecimiento endotelial vascular (Iwata *et al.* 2004; Revelli *et al.* 2009).

2.3.5. Factores antiapoptóticos

Los niveles altos de apoptosis de las GC se asocian con ovocitos y embriones de baja calidad. La activación de vías específicas como el TNF y el ligando fasL son marcadores importantes para determinar la apoptosis folicular. Incluso se ha observado que el ovocito expresa algunos receptores de la vía de apoptosis como el receptor de TNF y fas (Malamitsi-puchner *et al.* 2004; Naz *et al.* 1997).

2.3.6. Proteínas, péptidos y aminoácidos

En la literatura se observan estudios relacionados con proteínas, péptidos y aminoácidos sobre la calidad del ovocito como son; alfa-fetoproteína, antígeno carcinoembrionario y antígeno del cáncer 125 (Phocas *et al.* 1994), antígeno CD-44 (Ohta *et al.* 2001), alfa-1 antitripsina (Imoedemhe & Shaw 1986), leptina (Placido *et al.* 2006), endotelina-2 (Plonowski *et al.* 1999), inhibidor de la maduración del ovocito (Channing *et al.* 1982), homocisteína (Boxmeer *et al.* 2008), beta-endorfina (Fanchin *et al.* 2007), lactoferrina (Yanaihara *et al.* 2007), angiotensina II (Jarry *et al.* 1988), prorenina (Itskovitz *et al.* 1991), glicina y D-acido aspártico (Sinclair *et al.* 2008).

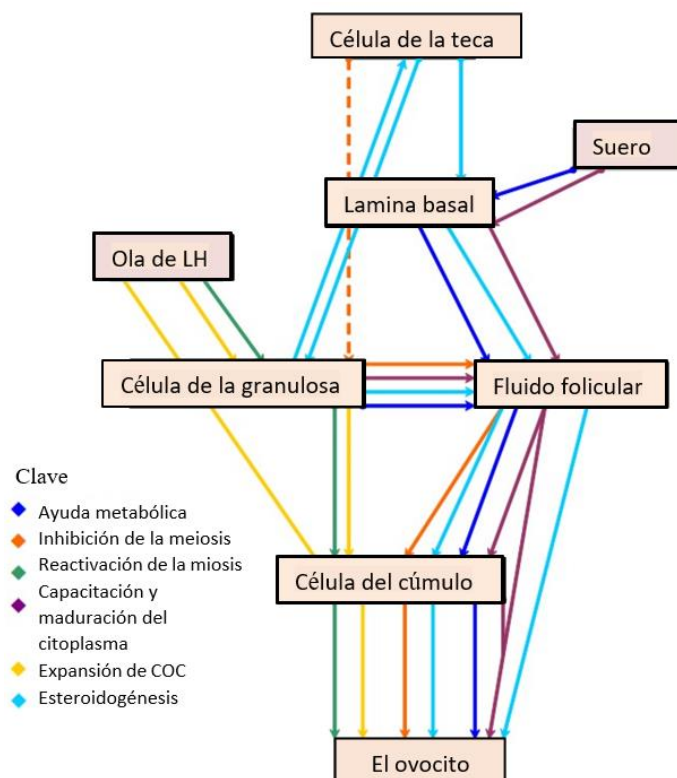
2.3.7. Azúcares

La calidad de los ovocitos se ha correlacionado con azúcares tanto en el folículo, fluido folicular y ovocito, las cuales son; hialuronano (Saito *et al.* 2000; Suchanek *et al.* 1994) y mioinicitol (Chiu *et al.* 2002).

2.3.8. Prostanoides

La prostaglandina F₂α (PGF₂α), es secretada por las GC bajo la estimulación ejercida por las gonadotropinas es propuesta como un marcador bioquímico de la calidad de ovocito. A concentraciones altas de PGF₂α en el FF se relaciona con ovocitos fertilizables. Además, a concentraciones altas de PGE₂ también se relaciona con ovocitos maduros de buena calidad (Webster *et al.* 1988).

Los eventos que conllevan a obtener un ovocito maduro de calidad se da por una interacción compleja y dinámica entre el folículo antral y el ovocito. Durante este proceso el ovocito debe completar su crecimiento final, su capacitación y maduración nuclear y citoplasmática. Los componentes del folículo antral son las células somáticas (teca, granulosa y cumulo), lamina basal y líquido folicular poseen roles activos y regulatorios en la diferenciación del ovocito (Figura 8).



Fuente: Adaptado de Hennes & Combelles (2012).

Figura 8. Contribuciones directas de los componentes del folículo antral a la diferenciación de ovocitos

Las flechas codificadas por colores definen la categoría de contribución ("contribuciones" incluyen productos, señales y otras influencias). La ausencia de un círculo en la base de una flecha indica que las contribuciones necesariamente viajan a través del compartimento, pero no se originan en él. Cada categoría de contribución puede contener varios puntos de origen; en estos casos, los nuevos puntos de origen no detienen el camino de las contribuciones que se originan anteriormente en el diagrama de flujo. La línea discontinua representa la incertidumbre actual con respecto a la participación de las células teca en la regulación meiótica.

2.4. FUNCIONES E INTERACCIONES ENTRE LAS HORMONAS Y LA OVOGÉNESIS

Los análisis hormonales han experimentado un gran progreso en las últimas décadas, permitiendo el desarrollo sostenible de la endocrinología y el desarrollo de nuevas técnicas de medición hormonal.

Hasta los años 60, los métodos analíticos disponibles eran fundamentalmente del tipo

colorimétrico, que permitían mediciones de orden de gramos, miligramos y microgramos. Después se desarrollaron técnicas de inmunoanálisis, en la que destacó el radioinmunoanálisis (RIA), que permitía mediciones de orden de nanogramos, picogramos y femtogramos. Luego surgió la inmunoradiometría (IRMA), donde la sustancia marcada es el anticuerpo. Posteriormente, surgió el análisis de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), donde se utiliza una enzima en vez de un isótopo, y los análisis de quimioluminiscencia. Las técnicas se basan en el principio de desplazamiento, siguiendo la ley de acción de masas (Díaz *et al.* 2015); en paralelo a los análisis ELISA, se desarrollaron los análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases, y sus variaciones, acoplando espectrometría de masa (MS/MS) para analizar múltiples hormonas a la vez (Stanczyk & Clarke 2010).

2.4.1. Análisis de estradiol, progesterona, testosterona y hormona antimülleriana

Un factor importante en la foliculogénesis es la dinámica hormonal. El estradiol, la progesterona y la testosterona juegan un papel importante en la fase folicular y lútea del ciclo ovárico, estos son producidos por diferentes tipos de celulares. Además de las citocinas (inhibina, activina, factor de crecimiento similar a la insulina, proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, factor de necrosis tumoral β , factor de crecimiento del endotelio vascular), entre otras (Wen *et al.* 2010).

La regulación de la foliculogénesis está mediada por el eje hipotálamo-pituitario-gonadal. Actualmente, existe controversia sobre si los niveles hormonales en el líquido folicular influyen en la calidad de los ovocitos (Kreiner *et al.* 1987). Se ha postulado que el cociente estradiol/progesterona es mejor indicador de la maduración ovocitaria que el tamaño del folículo y que el análisis a nivel del líquido folicular genera aún mayor sensibilidad en los resultados (Lee *et al.* 1987). También se ha planteado que la relación estradiol/testosterona en el líquido folicular puede estar asociada con atresia folicular temprana y con un efecto negativo sobre la viabilidad del ovocito, afectando la tasa de fertilización, desarrollo embrionario, implantación y gestación (Lisi *et al.* 2002).

Además, reportan relaciones positivas entre la concentración de hormona antimülleriana (AMH) en el líquido folicular y la calidad de ovocitos (Takahashi *et al.* 2008). La AMH se expresa en las células de la granulosa en los folículos primordiales después del reclutamiento hasta antes de la diferenciación en el folículo dominante. Su función es atenuar la diferenciación folicular y disminuir la sensibilidad de la FSH sobre sus receptores en las células de la granulosa. En ausencia de AMH, los folículos primordiales se reclutan

rápidamente, lo que conduce a un agotamiento de la reserva de éstos (Durlinger *et al.* 2001).

2.4.2. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)

La técnica ELISA fue conceptualizada y desarrollada por Peter Perlmann en la Universidad de Estocolmo. Perlmann publicó su primer artículo en 1971, y con el pasar de los años, la técnica fue mejorada hasta convertirse en uno de los ensayos más utilizados para la determinación cuantitativa de cualquier tipo de molécula (Lequin 2005).

Las características ventajosas de utilizar el ELISA son: versatilidad (se pueden usar distintos tipos de reactivos y/o combinaciones), simplicidad (análisis de múltiples muestras a la vez en menor tiempo), sensibilidad (amplificación de la reacción y la cuantificación mediante espectrofotometría).

De la técnica ELISA se derivan tres métodos: ELISA directo, ELISA indirecto y ELISA sándwich. La utilización de un método en particular dependerá de los objetivos del investigador. El ELISA directo consiste en la unión del antígeno a la fase sólida (base del pocillo) mediante absorción pasiva, se añade el anticuerpo marcado y posteriormente, se adiciona la solución sustrato/cromóforo. El ELISA indirecto se parece al ELISA directo, la diferencia está en que se añade un segundo anticuerpo marcado de otra especie sobre el primer anticuerpo. El ELISA sándwich posee dos variaciones (directo e indirecto). El ELISA sándwich directo consiste en la unión de un primer anticuerpo a la fase sólida, seguidamente, se utiliza el procedimiento del método del ELISA directo. El ELISA sándwich indirecto consiste en la unión del primer anticuerpo a la fase sólida, seguidamente, se utiliza el procedimiento del método del ELISA indirecto, el segundo y el tercer anticuerpo deben ser de una especie diferente al primer anticuerpo (Crowther 2009).

A. Reacciones inespecíficas

Las reacciones inespecíficas se pueden suscitar en cualquier tipo de superficie que no esté ocupada por la reacción de la fase sólida sobre el antígeno o anticuerpo. Para eliminar reacciones inespecíficas se añaden agentes bloqueantes en altas concentraciones inmunológicamente inertes, por lo que, no debe reaccionar con el antígeno o anticuerpo ni con los conjugados anticuerpo-enzima (Tabla 3).

Tabla 3. Agentes bloqueantes utilizados en el sistema ELISA

Proteína
Suero de conejo
Suero de caballo
Albumina de suero humano
Suero fetal bovino
Caseína
Hidrolizado de caseína
Gelatina
Detergentes
Tween-20
Tween-80
Triton X-100
Dodecilsulfato de sodio
Otros
Sulfato de dextrano
Coffee mate
Leche en polvo sin grasa

B. Conjugado anticuerpo-enzima, sustrato, cromóforos y reacción de parada

Existe una gran variedad de enzimas, sustratos, cromóforos y reactivos de parada que se utilizan en el sistema ELISA. Sin embargo, la elección dependerá principalmente de las propiedades de la enzima a conjugar con el anticuerpo (tabla 4 y 5).

Tabla 4. Etiquetas enzimáticas, cromóforos y condiciones de parada en ELISA

Etiqueta de la enzima	Sustrato	Cromóforo	Buffer
HRP (40 000)	Peroxido de hidrogeno (0.004%)	OPD	Fosfato/citrato, pH 5.0
		TMB	Acetato, 0.1 M, pH 5.6
	Peróxido de hidrogeno (0.002%)	ABTS	Fosfato/citrato, pH 4.2

	Peróxido de hidrogeno (0.006%)	5-AS	Fosfato, 0.2 M, pH 6.8
	Peróxido de hidrogeno (0.02%)	Diaminobencidina	TRIS o PBS, pH 7.4
AP (100 000)	Pnpp (2.5mM)	Pnpp	Dietanolamina (10 mM) y cloruro de magnesio (0.5 mM), pH 9.5
Galactosidasa (540 000)	ONPG (3mM)	ONPG	Cloruro de magnesio y 2-mercaptoetanol en PBS, pH 7,5

Tabla 5. Sustratos y cromóforos de uso común en ELISA

Etiqueta de la enzima	Color			Lectura (nm)		
	Sistema	No parada	parada	No parada	Parada	Solución de parada
HRP	OPD	Verde/naranja	Naranja/marrón	450	492	1.25 M de ácido sulfúrico
	TMB	Azul	Amarillo	650	450	SDS (1%)
	ABTS	Verde	Verde	414	414	---
	5-AS	Marrón	Marrón	450	450	---
	Diaminobencidina	Marrón	Marrón	N/A	N/A	---
AP	Pnpp	Amarillo/verde	Amarillo/verde	405	405	2 M de carbonato de sodio
Beta-galactosidasa	ONPG	Amarillo	Amarillo	420	420	2 M de carbonato de sodio
Ureasa	Urea bromocresol	Morado	Morado	588	588	Mertiolato (1%)

2.5. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL OVOCITO

El uso de las técnicas reproductivas que van desde la maduración *in vitro* (IVM), la fertilización *in vitro* (IVF), la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), el cultivo embrionario, la transferencia nuclear para construcción de embriones por clonación y la criopreservación de gametos y embriones tienen un factor crítico; la calidad del ovocito.

La calidad del ovocito afecta profundamente la fertilización monospermia, la supervivencia temprana del embrión, el mantenimiento del embarazo e incluso del desarrollo fetal. Por lo tanto, la búsqueda de predictores confiables en la calidad del ovocito es de mucha importancia. Básicamente, la calidad del ovocito se basa en predictores morfológicos y celulares/moleculares (Tabla 6).

Tabla 6. Resumen de predictores potenciales de calidad de ovocitos

Clasificación	Parámetros
Predictores morfológicos	
COC	Compactación y espesor de cúmulos; brillo del ooplasma
Ooplasma	Granularidad; coloración; inclusión; regiones agrupadas de los orgánulos
Cuerpo polar	Forma (redondo o ovoide); tamaño; superficie (suave o áspero); integridad (intacto o fragmentado)
Zona pelúcida	Espesor; organización
Espacio perivitelino	Tamaño; presencia o ausencia de partículas
Huso meiótico	Presencia; localización; longitud
Folículo/ovario	Dimensiones del folículo; existencia del CL con FD o quístico
Predictores celulares/moleculares	
Mitocondria	Distribución mitocondrial; niveles de ATP y mtDNA
G6PDH	Actividad de G6PDH (BCB+ o BCB-)
Calcio	Concentración de calcio en la membrana citoplasmática del ovocito inmaduros; concentración de calcio en ovocitos maduros
PDE3	Actividad de fosfodiesterasa 3 intracelular
GSH	Nivel de glutatión intracelular

Apoptosis	Apoptosis en granulosa o en células de cúmulos; ratio de Bcl-2 a Bax
IGF y IGFBP	Concentración de IGF-1 y IGFBP-1 en FF; ratio IGF-1/IGFBP-1 en suero o FF; perfil de expresión de IGFBPs de bajo peso molecular (IGFBP-4 y IGFBP-5) en FF
Superfamilia del TGF-Beta	Nivel de inhibina en FF; nivel activina A en FF; nivel basal de antimülleriana en suero
Esteroides	Ratio estradiol/testosterona (o estradiol/progesterona) en el FF; nivel de estradiol, LH, progesterona o prolactina en FF
Estrés oxidativo	Cantidad de 8-OHdG en las células de la granulosa; nivel de óxido nítrico; peróxido de lípidos; capacidad total de antioxidantes y ROS en el FF
Leptina	Nivel de leptina en el FF o suero
Perfil de expresión génica	Expresión del ácido hialurónico sintasa 2, ciclo oxigenasa 2 y gremlina 1 en células de cúmulos; abundancia relativa de pentraxina 3 en células de cúmulos

BCB, azul de cresilo brillante; CL, cuerpo lúteo; COC, complejos de cúmulos y ovocitos; DF, folículo dominante; FF, fluido folicular; G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; IGF, factor de crecimiento similar a la insulina; IGFBP, proteína de unión a IGF; LH, hormona luteinizante; 8-OHdG, 8-hidroxi-2-desoxiguanosina; TGF- β , factor de crecimiento transformante- β ; ROS, especies reactivas de oxígeno.

Fuente: Adaptado de (Wang & Sun 2007).

2.5.1. Evaluación morfológica del ovocito

A. Complejo cúmulo-ovocito (COC)

Se evalúa los COC mediante un sistema de puntuación sobre la expansión del cúmulo, se ha encontrado que una alta densidad del cúmulo se relaciona con una disminución en la madurez del ovocito. Además, la presencia de coágulos sanguíneos se asocia con una granulación central densa y tiene un efecto negativo sobre la tasa de fertilización (Thomas Ebner *et al.* 2008).

B. Zona pelúcida

Los criterios de evaluación de la zona pelúcida son: oscurecimiento, grosor, birrefringencia y cambios estructurales. Se cree que el oscurecimiento de la Zona pelúcida no influye en la

tasa de fertilización, calidad del embrión y tasa de implantación. La zona pelúcida delgada se relaciona con alta tasa de fertilización. La alta birrefringencia se relaciona con la calidad del ovocito y una baja birrefringencia se relaciona con mayor tasa de abortos espontáneos. La Zona pelúcida fragmentada se considera inadecuada para el tratamiento de ICSI (Loutradis *et al.* 1999).

C. Espacio perivitelino

Los criterios de evaluación más importantes del espacio perivitelino son: tamaño y la presencia de gránulos. Aumento de tamaño en el espacio perivitelino se asocia con una baja tasa de fertilización, pero con una mejor calidad embrionaria. La presencia de gránulos gruesos en el espacio perivitelino se asocia con baja tasa de implantación y de embarazo (Rienzi *et al.* 2008).

D. Morfología del primer cuerpo polar

Los criterios de evaluación más importantes en la morfología del primer cuerpo polar (PB1) son: fragmentación, tamaño y superficie. El PB1 grande o degenerado se relaciona con tasas de fertilización disminuida, pero no se mostró ninguna correlación en la morfología pronuclear o de la calidad del embrión. La superficie rugosa, fragmentada o agrandada se correlaciona con una baja tasa de fertilización/calidad del embrión (Navarro *et al.* 2009).

E. Forma del ovocito

Los criterios de evaluación más representativos en la morfología del ovocito son: la forma y el tamaño. Los ovocitos ovoides se relacionan con un retraso en la implantación (Ebner *et al.* 2008). Los ovocitos de gran tamaño se relacionan con mayor probabilidad de obtener embriones triploides a pesar de su desarrollo *in vitro* normal (Balakier 2002).

F. Apariencia del ooplasma

Los criterios de evaluación más importantes en la apariencia del ooplasma son: color y granulación. Los ovocitos con ooplasma oscuro se relacionan con embriones de menor calidad. Granulación periférica difusa en el ooplasma se relaciona con morfología pronuclear alterada. Sin embargo, en otro estudio se observó que cualquier tipo de granulación en el ooplasma se asocia a alta tasa de fertilización en comparación a los ovocitos con ausencia de gránulos (Wilding *et al.* 2007).

G. Presencia de vacuolas y/o inclusiones citoplasmáticas

La presencia de vacuolas en el citoplasma del ovocito se correlaciona negativamente con la tasa de criosupervivencia y competencia del desarrollo embriológico después de la fertilización. En un estudio se observó que la presencia de vacuolas e inclusiones se relaciona con una ligera disminución en la tasa de fertilización y desarrollo embrionario (Otsuki *et al.* 2007).

H. Presencia y morfología del huso meiótico

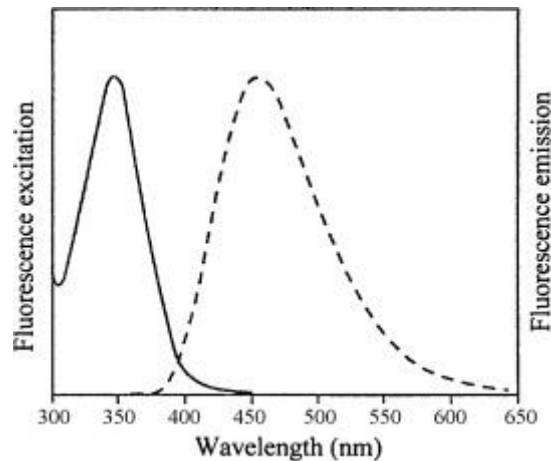
La presencia del huso meiótico se relaciona con mayor tasa de fertilización y tasa de embarazo. La posición del huso meiótico cerca al PB se relaciona con mayor tasa de fertilización y calidad de embriones tempranos. El mayor retraso del huso meiótico se relaciona con mayor tasa de blastocito y embarazo (Rama Raju *et al.* 2007).

I. Viscosidad del citoplasma y resistencia de la membrana celular

La resistencia y la viscosidad se analizan con la pipeta utilizada en el ICSI. La mayor viscosidad del citoplasma se relaciona con una menor tasa de fertilización. La resistencia de la membrana celular es un marcador negativo de embriones previo a la implantación (Ebner *et al.* 2003).

2.5.2. Determinación de la maduración del ovocito mediante tinción Hoechst

Los tintes Hoechst son tintes de bisbencimida que se utilizan para teñir el ADN. Los tintes Hoechst se excitan a un nivel máximo de ~360 nm y emiten ~460 nm de longitud de onda (Figura 9), son producidos por lámparas de xenón, mercurio o láseres UV (Bucevičius *et al.* 2018).



Fuente: Garner (2009).

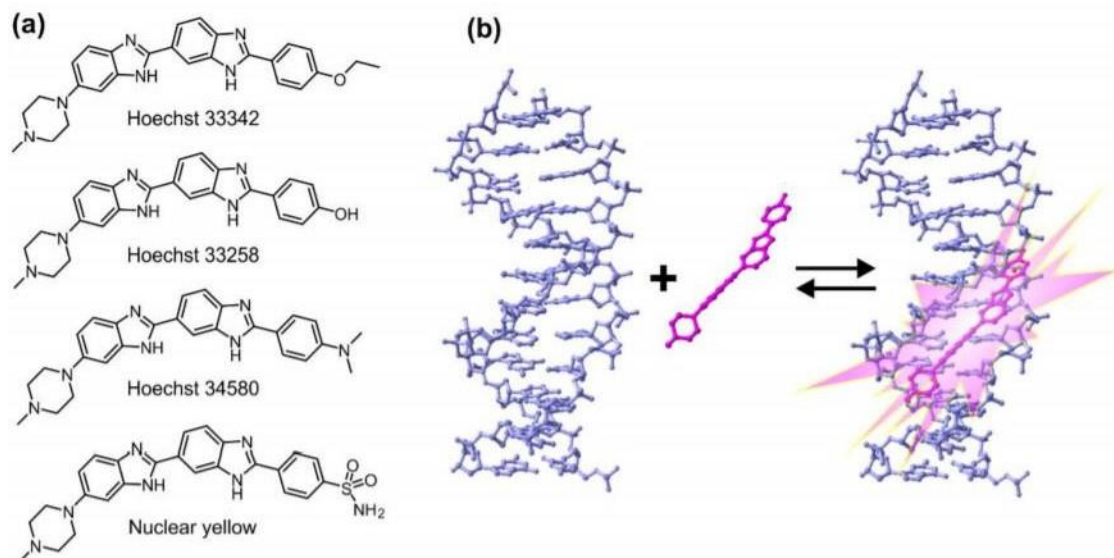
Figura 9. Espectros de absorción y emisión de fluorescencia de Hoechst 33342 cuando se une al ADN

La excitación máxima del colorante unido al ADN (línea continua) es de 350 nm, mientras que el máximo de emisión (línea punteada) es de 460 nm.

Cuando el tinte Hoechst se une al ADN, la intensidad de fluorescencia aumenta ~ 30 veces, asegurando una buena relación señal/ruido. La mejora de la fluorescencia resulta de la supresión de la relajación de rotación y reducción de la hidratación al unirse al ADN. El tinte se une a surcos menores de ADN en las regiones ricas de A-T (Adhikary *et al.* 2003).

La unión del Hoechst al ADN induce citotoxicidad mínima y se puede aplicar en células individuales como en tejidos celulares, puesto que, es compatible con técnicas inmunohistoquímicas (Loontjens *et al.* 1990).

En el mercado, existe cuatro tipos de tinción Hoechst; Hoechst 33342, Hoechst 33258, Hoechst 34580 y Hoechst S769121 (llamado también amarillo nuclear) (Figura 10). Los diferentes tipos de tinciones Hoechst se utilizan para aplicaciones similares. Sin embargo, sus propiedades son ligeramente diferentes. Por ejemplo, el Hoechst 33342 es significativamente más permeable a la célula debido a la adición del grupo etil lipofílico, por lo que, generalmente se utiliza para la tinción de células vivas (Bucevičius *et al.* 2018).



Fuente: Bucevičius et al. (2018).

Figura 10. Modo de unión al ADN y estructuras químicas de los tintes Hoechst

(a) estructuras de tintes Hoechst utilizados para la tinción de ADN; (b) Los tintes Hoechst se unen al surco menor del ADN B, lo que resulta en un aumento de aproximadamente 30 veces en su fluorescencia.

En estudio de ovocitos se recomienda que la exposición a luz UV sea menor a 30 segundos, ya que, la exposición prolongada genera mutaciones en el ADN nuclear y mitocondrial disminuyendo la tasa de fertilización *in vitro*. El efecto sobre las mitocondrias se relaciona con un aumento en la concentración de ROS, lo que conlleva a la muerte celular (Gil *et al.* 2012).

2.5.3. Determinación de la maduración del ovocito mediante tinción brillante de azul de cresilo

La tinción brillante azul de cresilo (BCB) se utiliza para determinar la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). La tinción BCB es uno de los métodos menos investigados para evaluar la viabilidad de los ovocitos (Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.* 2014).

Una de las funciones de la enzima G6PDH es producir azúcares de ribosa para la síntesis de ácidos nucleicos a través del ciclo de la pentosa. Además, produce NADPH que se utiliza en la síntesis de lípidos (Wood 1986).

La enzima G6PDH se sintetiza en el ovocito durante la ovogénesis mientras que el folículo crece. El BCB es un colorante que puede ser degradado por la enzima G6PDH. Por lo tanto,

una gran acumulación de la enzima G6PDH en los ovocitos en crecimiento metabolizan al BCB conduciendo a un citoplasma incoloro, mientras que, el citoplasma de los ovocitos completamente maduros presentan una coloración azul, debido a los bajos niveles de la actividad de la enzima G6PDH (Ericsson *et al.* 1993).

La actividad de la enzima G6PDH se ha correlacionado con indicadores de maduración citoplasmática, organización de los gránulos y las mitocondrias, nivel de glutatión intracelular (GSH), la actividad mitocondrial y el contenido de lípidos citoplasmáticos (Jeong *et al.* 2009).

2.5.4. Análisis de apoptosis del ovocito mediante tinción con Anexina V/PI

La apoptosis es el proceso de muerte celular programada, participa en la eliminación de las células germinales a lo largo de la etapa de ovogénesis e incluso después de la ovulación (Hutt 2014). Más del 99 por ciento de las células germinales son eliminadas del ovario por apoptosis con el nombre de atresia folicular, cerca del 1 por ciento culminan en el proceso de ovogénesis (Matsuda *et al.* 2012). La apoptosis tiene una estrecha relación con la comunicación entre las células de la granulosa y el ovocito, incluso se cree que la apoptosis del ovocito está mediada por la apoptosis de las células de la granulosa, las cuales aportan factores de crecimiento, nutrientes y factores de supervivencia al ovocito (Chaube *et al.* 2014). La integridad de las células de la granulosa protege al ovocito del daño del estrés oxidativo (Chaube *et al.* 2005), es decir, cuanto mayor es el número de capas de células de la granulosa, menor es el proceso de apoptosis del ovocito (Yuan *et al.* 2005). La susceptibilidad a la apoptosis aumenta en condiciones de cultivo *in vitro* (Tripathi *et al.* 2013). Las características típicas de las células apoptóticas incluyen la contracción celular, la translocación de fosfatidilserina a la membrana citoplasmática externa, la fragmentación del ADN y la escisión celular en cuerpos apoptóticos (Li *et al.* 2009).

Actualmente, existen muchas técnicas para determinar la apoptosis tanto citoplasmática como nuclear, denominándose apoptosis temprana; citoplasmática y apoptosis tardía; nuclear. La técnica más simple utilizada para determinar la apoptosis temprana y tardía es la tinción con anexina V y yoduro de propidio (PI), respectivamente (Rieger *et al.* 2011). La anexina V/PI se determina a través de diferencias en la integridad y permeabilidad de la membrana citoplasmática, teniendo la anexina V afinidad por la fosfatidilserina. En el proceso de apoptosis temprana, la fosfatidilserina es translocada a la parte exterior de la membrana citoplasmática por la actividad de la caspasa-3, donde se une la anexina V marcada (Niu & Chen 2010). El PI no tiñe las células apoptóticas vivas

debido a la presencia de la membrana citoplasmática intacta. En las células necróticas y apoptóticas tardías, la integridad de la membrana nuclear y citoplásmica está disminuida, lo que permite que el PI atraviese las membranas y se intercale con los ácidos nucleicos y muestre fluorescencia roja (Rieger *et al.* 2011).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS QUÍMICOS

Todos los reactivos utilizados son de Sigma-Aldrich (Burlington, EE. UU.) a menos que se indique lo contrario. Todos los medios preparados se filtraron antes de su uso (0,22 μm ; Aijiren, China).

3.2. DECLARACIÓN DE ÉTICA

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados de conformidad con el Comité de Ética Animal de la Universidad Nacional del Altiplano, cumpliendo con todos los principios éticos de la investigación animal.

3.3. UBICACIÓN Y ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El experimento se realizó en la región de Puno (altitud: 3 847 msnm, Latitud: 15° 50' 26" Sur, Longitud: 70° 1' 41" Oeste). Se utilizaron un total de 58 Alpacas (*Vicugna pacos*), con un puntaje de condición corporal de 3.28 ± 0.52 (escala de 1-5) con edades entre 3 - 5 años. Análisis de maduración nuclear, citoplasmática y apoptosis realizados en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú. Mientras, los análisis hormonales se realizaron en el Laboratorio de Histopatología y Teratología de la misma Universidad.

3.4. OVOCITOS DERIVADOS DEL CAMAL DE NUÑO A

Los ovarios de alpaca (n = 116) fueron recolectados del matadero del Distrito de Nuñoa, Puno, dentro de los 30 minutos posteriores al sacrificio de los animales experimentales y luego fueron transportados por 6 horas al laboratorio en termos a 33 – 36 °C en solución salina suplementada con estreptomina (0.05 mg/mL). En el laboratorio, los ovarios se lavaron 3 veces y se secaron con una toalla de papel. Los folículos se seleccionaron según el diámetro (1-2 mm, 2-3 mm, 3-4 mm, 4-5 mm, 5-6 mm, 6-7 mm, 8-9mm, 10-11, 15-16 mm y 25-26 mm) y se aspiraron con una aguja de 20G x 1 pulgada acoplada a una jeringa de 1 mL. Ovarios con folículos menores a 1mm fueron diseccionados para extraer la mayor

cantidad de ovocitos posibles. El líquido folicular, según diámetro folicular, se centrifugó a 1500 RPM/min, se recogió el sobrenadante en viales de 2 ml y se almacenó a -20 °C hasta la realización de los análisis hormonales. Mientras, los ovocitos fueron atemperados para el cultivo de maduración.

3.5. MEDIO DE CULTIVO DE MADURACIÓN

El medio de maduración 1 (MM1) fue preparado en base a medios reportados por Tribulo (2019). MM1 contiene TCM-199, suero bovino fetal al 10 por ciento (v/v), 2 µg/ml de 17β-estradiol, 25 µg/ml de hormona estimulante del folículo porcino (pFSH) (Folltropin®-V; Vetoquinol, Canadá), 22 µg/mL de sodio piruvato, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina y 1 mM de alanil-glutamina (Tríbulo *et al.* 2019). El medio de maduración 2 (MM2) preparado en base a lo informado por Saadeldin (2019). El MM2 contiene TCM-199, tampón HEPES 25 mM, NaHCO₃ 2 mM, suero fetal bovino al 10 por ciento (v/v), pFSH 10 µg/mL, gonadotropina coriónica humana (hCG) 10 µg/mL (Choriomon; IBSA, Suiza), 1 µg/mL de 17β-estradiol, 20 ng/mL de factor de crecimiento epidémico (EGF), 1 µg/mL de insulina, 0.3 µM de cisteamina, 1 mM de L-glutamina, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina (Saadeldin *et al.* 2019) (Tabla 7).

Tabla 7. Medios de cultivo utilizados para la maduración de los ovocitos

MM1	MM2
TCM-199	TCM-199
Suero bovino fetal al 10% (v/v)	Tampón HEPES 25 mM
2 µg/ml de 17β-estradiol	NaHCO ₃ 2 mM
25 µg/ml pFSH	Suero fetal bovino al 10% (v/v)
22 µg/mL de sodio piruvato	pFSH 10 µg/mL
50 µg/mL de sulfato de gentamicina	hCG 10 µg/mL
1 mM de alanil-glutamina	1 µg/mL de 17β-estradiol
-----	20 ng/mL EGF
-----	1 µg/mL de insulina
-----	0.3 µM de cisteamina
-----	1 mM de L-glutamina
-----	50 µg/mL de sulfato de gentamicina

3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para todos los experimentos se utilizó el diseño completamente al azar (DCA). Los complejos cúmulo-ovocito (COC) se distribuyeron aleatoriamente en los dos grupos experimentales (MM1 y MM2) con tres repeticiones por experimento. Después de la maduración *in vitro*, los ovocitos se desnudaron con hialuronidasa al 1 por ciento durante 15 minutos a 28.5°C en condiciones de CO₂ al 5 por ciento. Posteriormente, los ovocitos se distribuyen para análisis de maduración nuclear, citoplasmática y apoptosis, así como para el análisis morfológico.

El líquido folicular se obtuvo de acuerdo al diámetro folicular; teniendo 10 grupos de diámetros foliculares (1-2 mm, 2-3 mm, 3-4 mm, 4-5 mm, 5-6 mm, 6-7 mm, 8-9 mm, 10-11, 15-16 mm y 25-26 mm). El líquido folicular de cada grupo de diámetro folicular se sometió al análisis hormonal por espectrofotometría con dos replicas para la determinación de la concentración de estrógeno, progesterona, testosterona y hormona antimülleriana (Figura 11).

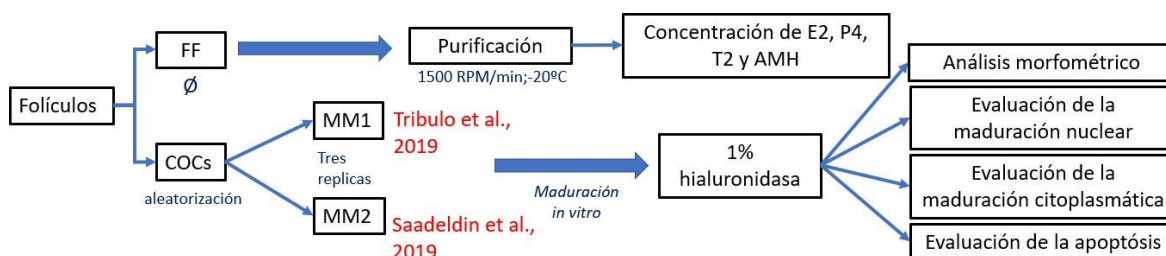


Figura 11. Esquema de los experimentos

3.7. MADURACIÓN DE OVOCITOS

Se seleccionaron los COC con el uso de un estereomicroscopio y basados en sus características morfológicas; utilizándose los ovocitos que presentaban más de una capa de células del cúmulo. Los 532 COC seleccionados fueron asignados a cada uno de los dos grupos experimentales (MM1 y MM2). Cada 20-30 ovocitos fueron transferidos a pocillos con 60 µL de medio de maduración, cubiertos con aceite mineral y cultivados en incubadora portátil durante 40 horas (Huanca *et al.* 2014) en condiciones de 5 por ciento CO₂ (producido por gránulos efervescentes) y 38.5°C (utilizando un baño termostático)(Pérez 2019).

3.8. EVALUACIÓN MORFOMÉTRICA DE OVOCITOS

Se compararon los diámetros de los ovocitos, el grosor de la zona pelúcida y el área del espacio perivitelino de cada uno en los grupos experimentales (MM1 y MM2). Las fotografías fueron tomadas con una cámara de microscopio invertido Leica (Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Alemania; 40X). La media determinada y las mediciones se realizaron con el software ImageJ (versión 1.8.0; Institutos Nacionales de Salud).

3.9. EVALUACIÓN DE LA MADURACIÓN NUCLEAR

Los COC recuperados se expusieron a una solución de hialuronidasa al 1 por ciento durante 15 minutos a 38.5°C en CO₂ al 5 por ciento y se sometieron a pipeteo sucesivo para separar las células del grupo de ovocitos. Luego, los ovocitos se fijaron con una solución de etanol: ácido acético glacial (3:1) en un ambiente hermético durante al menos 48 horas a 4°C (Simões *et al.* 2021). Los ovocitos fueron fijados colocando de 5 a 10 ovocitos entre las láminas portaobjeto y cubreobjeto y una mezcla de vaselina: parafina (2:1) colocada en cada esquina del cubreobjetos. El cubreobjetos se presionó ligeramente hasta que se hizo contacto con los ovocitos. La tinción se realizó por acción capilar con una solución de orceína al 1 por ciento en ácidoacético al 45 por ciento durante 10 minutos. La evaluación de la maduración nuclear se realizó utilizando un microscopio invertido Leica (Leica Microsystems; Wetzlar, Alemania; 40X). Los ovocitos se clasificaron en base a la presencia de vesícula germinal (VG), metafase I (MI), metafase II (MII) y estructuras degeneradas (DG). Los ovocitos degenerados presentaron aberraciones cromosómicas, presencia de cromatina difusa o indefinida.

3.10. EVALUACIÓN DE LA MADURACIÓN CITOPLASMÁTICA

Los ovocitos desnudos se incubaron en una solución de azul de cresilo brillante (BCB) de 26 µM (Toronto Research Chemicals INC; Toronto, Canadá) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 90 minutos a 38.5 °C y CO₂ al 5 por ciento (Ayala *et al.* 2018). La evaluación de la maduración citoplasmática se realizó con un microscopio invertido Leica. Los ovocitos se clasificaron según la presencia (BCB+) o ausencia (BCB-) de tinción BCB.

3.11. EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS

Los COC recuperados se expusieron a una solución de hialuronidasa al 1 por ciento durante 15 minutos a 38.5°C en CO₂ al 5 por ciento y se sometieron a pipeteos sucesivos para separar

las células del grupo de ovocitos. Para la evaluación de la apoptosis temprana y tardía, se utilizó el kitI de detección de apoptosis con anexina V comercial FITC (BD Biosciences, Franklin Lakes,NJ, EE. UU.; 556547). En cada portaobjetos se contuvo de 5 a 10 ovocitos, se agregó 20 μ L de un tampón de unión de anexina V y agua destilada (1 volumen de tampón de unión de anexina V y 9 volúmenes de agua destilada) y 1 μ L de FICT Anexina V y 1 μ L de yoduro de propidio (PI). Se agitó suavemente con una pipeta e incubó durante 15 minutos a 25 °C en la oscuridad. La evaluación de la apoptosis se realizó con un microscopio Nikon EclipseE400 (Nikon Instruments; Melville, NJ, EE. UU.; 40X). Se usó un filtro láser de 490-525 nm para la detección de FICT Anexo V y un filtro láser de 555-603 nm para la detección de yoduro de propidio. Los ovocitos se evaluaron según la fluorescencia relativa (porcentaje).

3.12. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE ESTRADIOL

Para medir los estrógenos (E2) se utilizó una muestra de 25 μ L del sobrenadante obtenido tras la centrifugación del líquido folicular y un Kit ELISA comercial de alta sensibilidad para la detección de E2 (Abcam, Cambridge, MA, EE. UU.; ab108667). Las muestras fueron procesadas según las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo para E2 es de 8.26 pg/mL. El método permite determinar E2 entre rangos de 20 a 2000 pg/mL. La reactividad cruzada del anticuerpo para estrógeno y metabolitos es: estradiol 100 por ciento, estrona 2.0 por ciento, estriol 0.39 por ciento, fulvestrant 0.09 por ciento, testosterona 0.02 por ciento, cortisol 7×10^{-3} por ciento, progesterona 3×10^{-4} por ciento y dehidroepiandrosterona 1×10^{-4} por ciento. Los coeficientes de variación inter-ensayo e intra-ensayo son ≤ 10 por ciento ($n = 20$) y ≤ 9 por ciento ($n = 20$), respectivamente. Los valores obtenidos se calcularon en unidades de pg/mL. La densidad óptica de las muestras medida a 450 nm. El modelo de Regresión Logística de Cuatro Parámetros utilizado para ajustar la curva estándar con $R^2 = 0.996$.

3.13. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA

Para medir la progesterona (P4) se utilizó una muestra de 100 μ L del sobrenadante obtenido tras la centrifugación del líquido folicular y un kit comercial ELISA de alta sensibilidad para la detección de P4 (ENZO Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, EE. UU.; ADI -900-011). Las muestras fueron procesadas según las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo para P4 es de 8.57 pg/mL. El método permite determinar P4 entre rangos de 15.62 a 500 pg/mL. La reactividad cruzada del anticuerpo para la progesterona y los metabolitos son: progesterona 100 por ciento, 5α -pregnano-3,20-diona 100 por ciento, 17-OH-

progesterona 3,46 por ciento, 5-pregnen-3 β -o1-20-ona 1.43 por ciento, corticosterona 0.77 por ciento, 4-androsteno-3,17-diona 0.28 por ciento, desoxicorticosterona 0.056 por ciento, DHEA 0.013 por ciento, 17 β -estradiol <0.001 por ciento, estrona <0.001 por ciento, estriol <0.001 por ciento, testosterona <0.001 por ciento, hidrocortisona <0.001 por ciento, 5 α -Pregnane-3 α , 20 α -diol <0.001 por ciento y Danazol <0.001 por ciento. Los coeficientes de variación intra- ensayo son ≤ 7.6 por ciento (23.1 pg/ml), ≤ 5.4 por ciento (118.4 pg/ml), ≤ 4.9 por ciento (325.9 pg/ml) e inter-ensayo ≤ 6.8 por ciento (20.4 pg/ml), ≤ 8.3 por ciento (107.7 pg/mL), ≤ 2.7 por ciento (314.1 pg/mL). Los valores obtenidos se calcularon en unidades de pg/mL. La densidad óptica de las muestras medida a 405 nm, preferiblemente con una corrección entre 570 y 590 nm. El modelo de Regresión Logística de Cuatro Parámetros utilizado para ajustar la curva estándar con $R^2 = 0.993$.

3.14. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE TESTOSTERONA

Para medir la testosterona (T2) se utilizó una muestra de 25 μ L del sobrenadante obtenido tras la centrifugación del líquido folicular y un Kit ELISA comercial de alta sensibilidad para la detección de T2 (Abcam, Cambridge, MA, EE. UU.; ab108666). Las muestras fueron procesadas según las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo para T2 es de 0.10 ng/mL. El método permite determinar T4 entre rangos de 0.2 a 16ng/mL. La reactividad cruzada del anticuerpo para la testosterona y los metabolitos son: testosterona 100 por ciento, DHT 2.03 por ciento, 17 α estradiol 0.16 por ciento, androsterona 0.05 por ciento, androstenediona 0.01 por ciento, cortisol 0.01 por ciento, prednisona 0.01 por ciento, DHEA-S 0.0 por ciento, cortisona 0.0 por ciento. Los coeficientes de variación inter-ensayo e intra-ensayo son ≤ 8.3 por ciento (n = 9) y ≤ 7.0 por ciento (n = 16), respectivamente. Los valores obtenidos se calcularon en unidades de ng/mL. La densidad óptica de las muestras medida a 450 nm, preferiblemente con una corrección entre 620 y 630 nm. Se utilizó el modelo de Regresión Logística de Cuatro Parámetros para ajustar la curva estándar con $R^2 = 0.999$.

3.15. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA

Para medir la hormona antimülleriana (AMH) se utilizó una muestra de 100 μ L del sobrenadante obtenido tras la centrifugación del líquido folicular y un kit ELISA comercial de alta sensibilidad para la detección de AMH (USBiological Life Sciences, Salem, MA, EE. UU.; 381889). Las muestras fueron procesadas según las instrucciones del fabricante. La

sensibilidad del ensayo para AMH es de 0,19 ng/mL. El método permite determinar AMH entre rangos de 0.31 a 20 ng/mL. No muestra reactividad cruzada significativa. Los coeficientes de variación intra-ensayo son 5.71 por ciento (1.05 ng/ml), 4.41 por ciento (2.72 ng/ml), 3.41 por ciento (9.38 ng/ml) e inter-ensayo 5.71 por ciento (1.05 ng/ml), 4.76 por ciento (2.94 ng/mL), 2.7 por ciento (9.81 ng/mL). Los valores obtenidos se calcularon en unidades de ng/mL. La densidad óptica de las muestras se midió a 450 nm. Se utilizó el modelo logístico de cuatro parámetros para ajustar la curva estándar con $R^2 = 0.999$.

3.16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los análisis estadísticos de maduración *in vitro* entre las dos unidades experimentales (MM1 y MM2), se realizará la prueba *t-test* Student para las variables de respuesta; diámetro de ovocito, grosor de la zona pelúcida, área del espacio perivitelino, maduración nuclear, maduración citoplasmática y apoptosis.

Para los resultados de los análisis hormonales en función al diámetro del folículo, se evaluará utilizando un diseño completamente al azar (DCA) y la técnica estadística a utilizarse será un ANOVA. Además, se complementará con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Todos los análisis estadísticos y gráficos se realizaron utilizando el sistema de análisis de datos para Windows (software GraphPad Prism versión 8.0.1 y la herramienta de análisis de datos de Microsoft Excel, como MyCurveFit de la empresa MyAssays). Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar. Un nivel de probabilidad de $P < 0.05$ considerado estadísticamente significativo.

El ajuste de la curva estándar para el análisis hormonal de Elisa fue realizado con el modelo de Regresión Logística de Cuatro Parámetros, en base a la siguiente ecuación:

$$Y = d + \frac{a - d}{1 + (c)^b}$$

Donde,

Y = Concentración de hormonas

X = Densidad óptica

a = Valor mínimo

b = Valor máximo

c = Punto de inflexión

d = Pendiente de la curva en el punto c

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Efecto de los dos medios de maduración sobre la morfometría de los ovocitos

Los análisis morfométricos se evaluaron en función al diámetro del ovocito, espesor de la zona pelúcida y área del espacio perivitelino después de la maduración *in vitro* con los medios de maduración MM1 y MM2 (Figura 12).

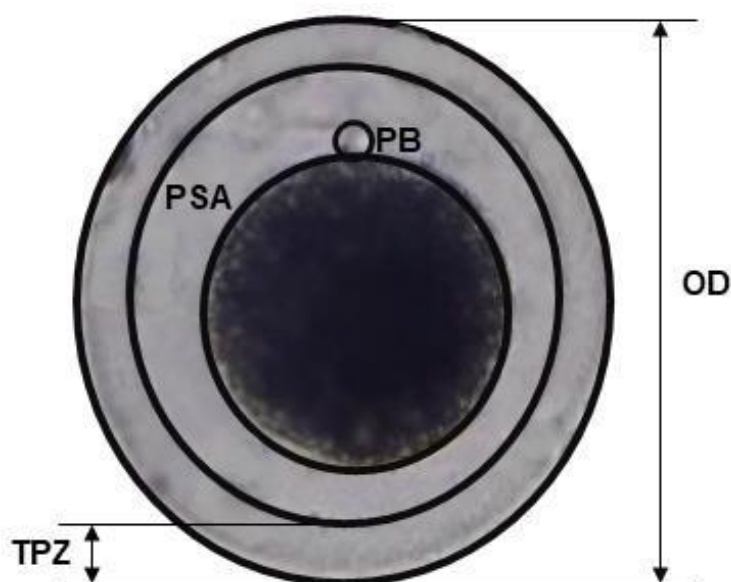


Figura 12. Análisis morfométrico de ovocitos de alpaca madurados in vitro

Las imágenes capturadas se analizaron utilizando el software ImageJ para medir la distancia de píxeles. OD: diámetro del ovocito; TPZ: espesor de la zona pelúcida; PSA: área del espacio perivitelino; PB: cuerpo polar.

El diámetro de los ovocitos después de la maduración *in vitro*, fue de $133.42 \pm 14.56 \mu\text{m}$ y $136.14 \pm 15.24 \mu\text{m}$ para el MM1 y MM2, respectivamente (Fig. 13). No hubo diferencias significativas ($P=0.397$) entre los grupos. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas ($P=0.919$) respecto al espesor de la zona pelúcida (Fig. 14) en los medios de cultivo MM1 ($16.84 \pm 3.96 \mu\text{m}$) y MM2 ($16.73 \pm 4.98 \mu\text{m}$); sin embargo, hubo

diferencias significativas ($P=0,0005$) entre el área del espacio perivitelino del MM1 (11018.91 ± 2465.40) μm^2 y MM2 (8686.18 ± 3016.88) μm^2 (Fig. 15).

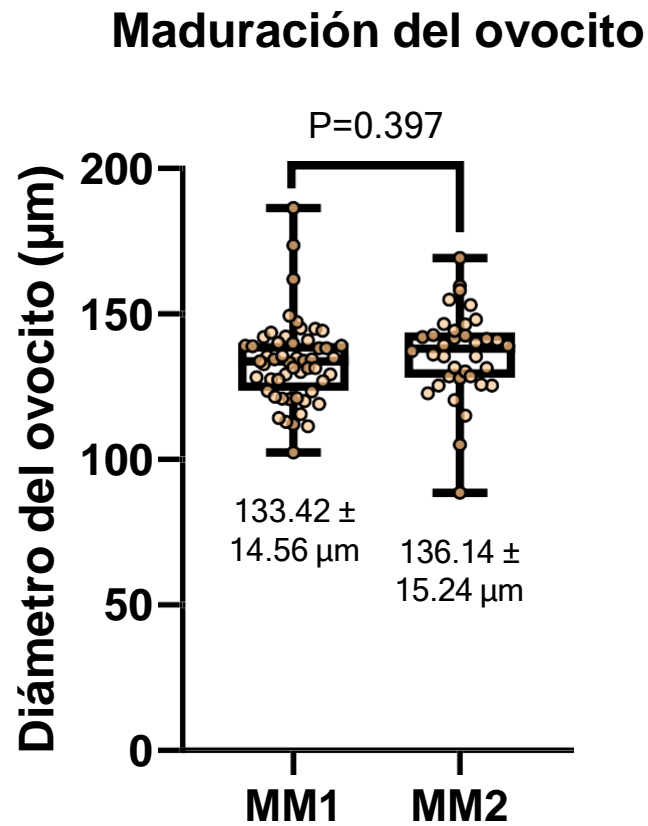


Figura 13. Medición del diámetro del ovocito (μm) después de la maduración in vitro usando dos medios de maduración; MM1 y MM2

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.397$) entre los dos grupos experimentales.

Maduración del ovocito

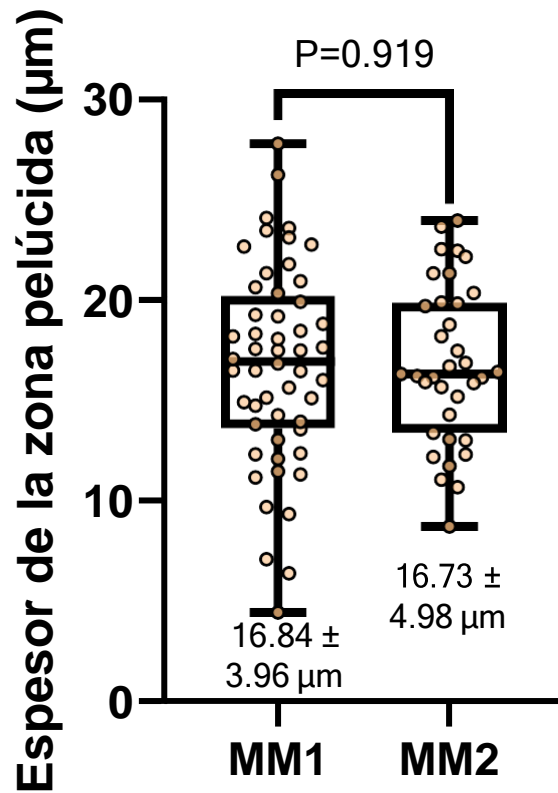


Figura 14. Medición del espesor de la zona pelúcida (µm) después de la maduración invitro usando dos medios de maduración; MM1 y MM2

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.919$) entre los dos grupos experimentales.

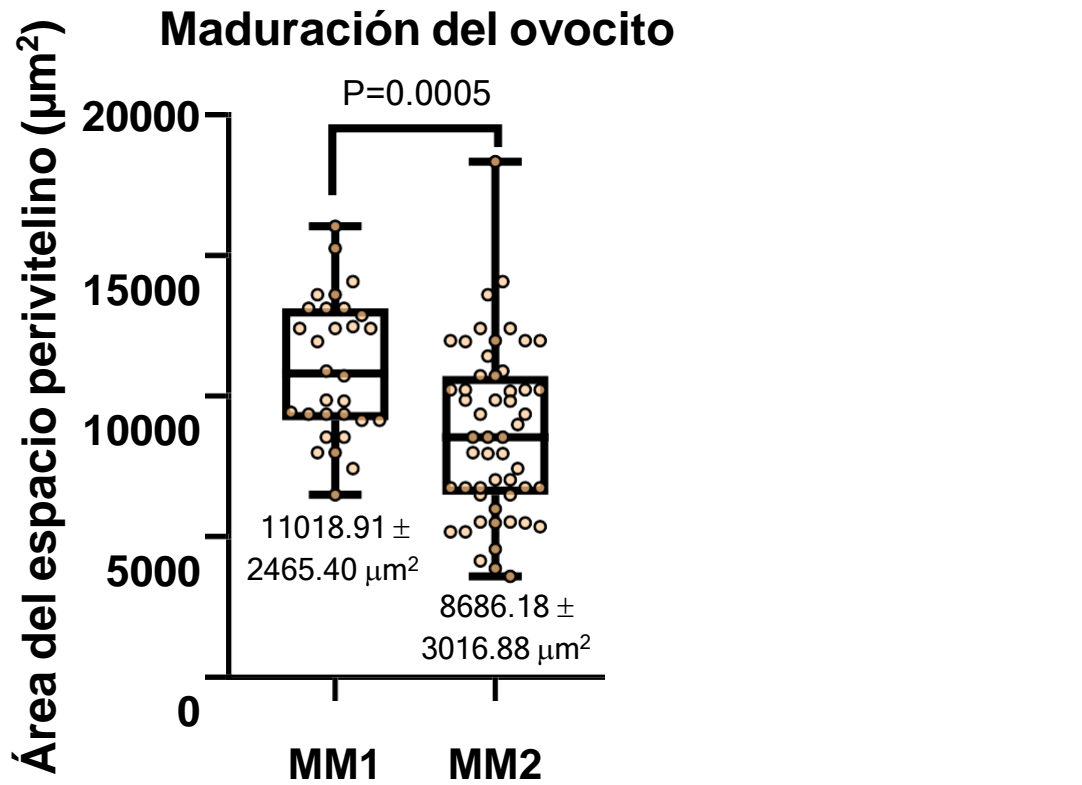


Figura 15. Medición del área del espacio perivitelino (μm^2) después de la maduración invitro usando dos medios de maduración; MM1 y MM2

Se encontraron diferencias significativas ($P = 0.0005$) entre los dos grupos experimentales.

4.1.2. Efecto de los dos medios en la maduración nuclear de ovocitos

El análisis de maduración nuclear se realiza mediante la tinción de acetato-orceína, donde se identifican la vesícula germinal, ovocito en metafase I, ovocito en metafase II y ovocitos degenerados (Figura 16).

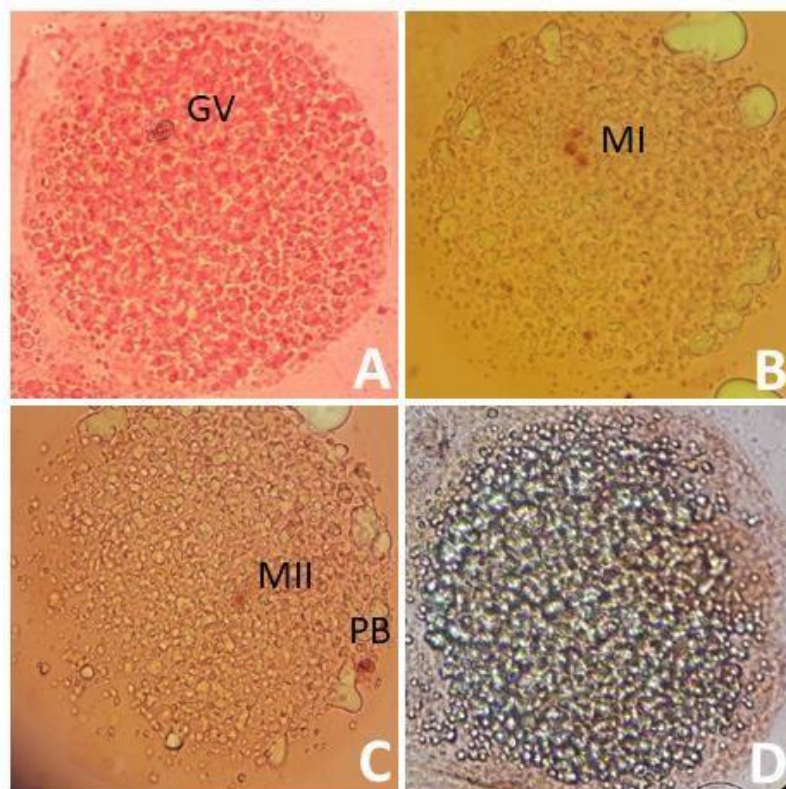


Figura 16. Clasificación de la maduración nuclear en ovocitos de Alpaca

Maduración nuclear evaluada mediante tinción de acetato-orceína. A) Ovocito en estado de vesícula germinal, B) Ovocito en estado de metafase I, C) Ovocito en estado de metafase II y D) Ovocito degenerado. GV: vesícula germinal; MI: metafase I; MII: metafase II; PB: cuerpo polar.

La Figura 17 muestra el porcentaje de maduración nuclear de los ovocitos después de la maduración *in vitro*. Los porcentajes de metafase II fueron 46.08 ± 5.90 por ciento y 54.65 ± 3.0 por ciento, para el MM1 y MM2 respectivamente. No hubo diferencias significativas ($P=0.088$) entre los dos medios de cultivo. Lo mismo se observó para el porcentaje de metafase I (31.54 y 20.08) por ciento, vesícula germinal (8.51 y 9.01) por ciento y estructuras degeneradas (13.87 y 16.26) por ciento, para MM1 y MM2 respectivamente.

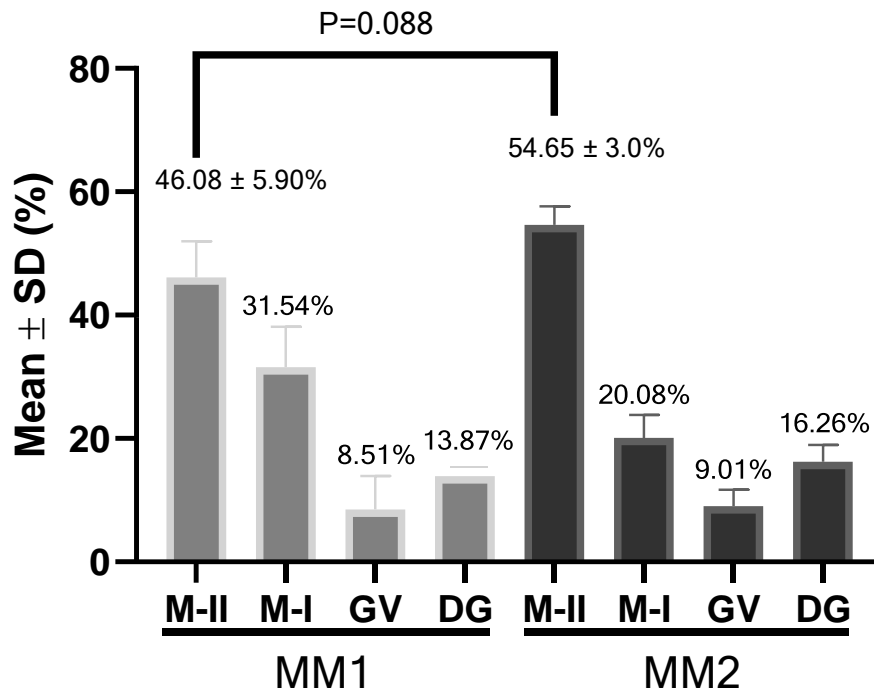


Figura 17. Medida de maduración nuclear (%) después de la maduración *in vitro* usando dos medios de maduración; MM1 y MM2

No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.088$) en la metafase II entre los dos grupos experimentales. MII: metafase II; MI: metafase I; GV: vesícula germinal; DG: degenerado.

4.1.3. Efecto de los dos medios sobre la maduración citoplasmática del ovocito

El análisis de maduración citoplasmática se realiza mediante la tinción azul de cresilo brillante (BCB), después del cultivo *in vitro*, utilizando los medios de cultivo de los grupos experimentales (MM1 y MM2) (Figura 18).

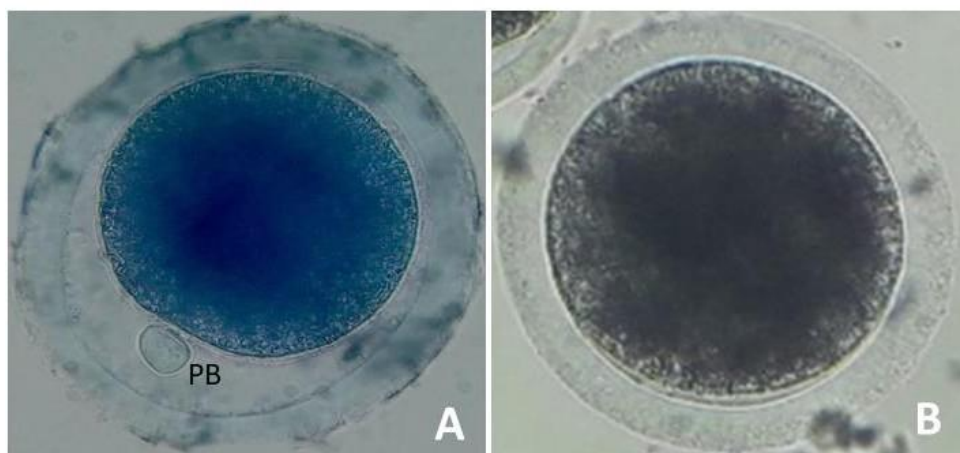


Figura 18. Clasificación de la maduración citoplasmática en ovocitos de Alpaca.

Maduración citoplasmática mediante tinción BCB

Los ovocitos se clasifican según la presencia (A) y ausencia (B) de tinción BCB. BCB: azul de cresilo brillante; PB: cuerpo polar.

La figura 19, muestra el porcentaje de tinción BCB+ para la maduración de ovocitos citoplasmáticos después de la maduración *in vitro*. Hubo diferencias significativas ($P=0.014$) entre medios de cultivo en el porcentaje de maduración citoplasmática; los ovocitos cultivados en MM1 (67.78 ± 4.50 por ciento) tuvieron una menor maduración citoplasmática en comparación con MM2 (77.61 ± 3.58 por ciento).

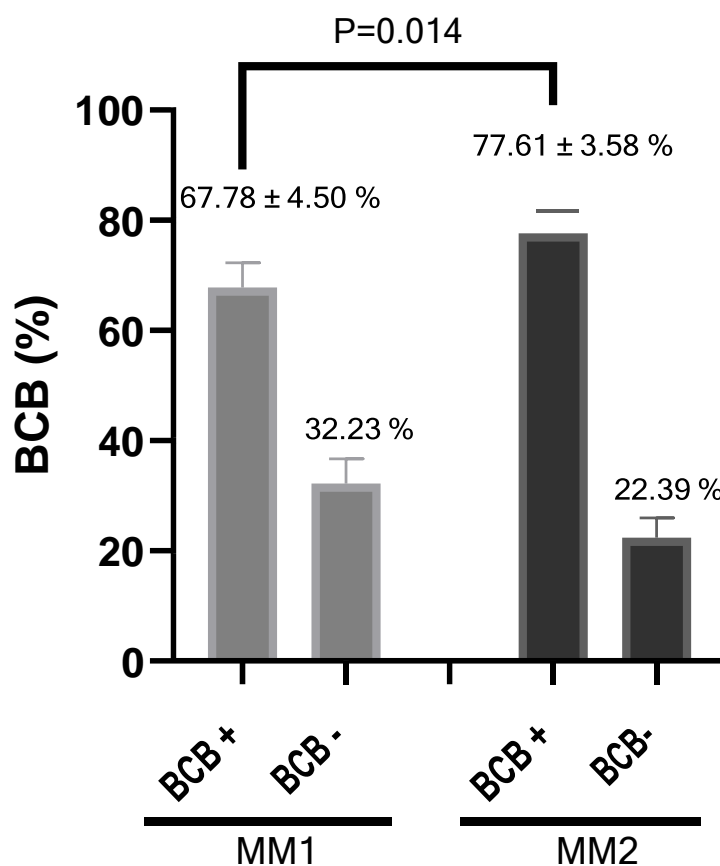


Figura 19. Medida de la maduración citoplasmática (%) después de la maduración *in vitro* usando dos medios de maduración; MM1 y MM2

Se encontraron diferencias significativas ($P = 0.014$) entre los dos grupos experimentales. BCB: azul de cresilo brillante.

4.1.4. Efecto de los dos medios de maduración sobre la apoptosis

El análisis de apoptosis se realizó mediante la tinción de fluorescencia de anexina V y yoduro de propidio sobre los ovocitos madurados *in vitro*, utilizando los medios de cultivo de los grupos experimentales (MM1 y MM2) (Figura 20).

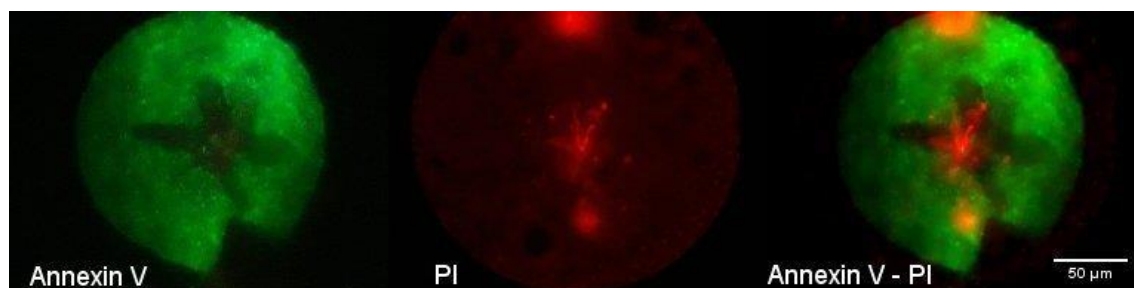


Figura 20. Microfotografía de fluorescencia de ovocitos tras maduración *in vitro* con anexina V/PI

La anexina V se usa para determinar la apoptosis temprana. Mientras tanto, PI para determinar la apoptosis tardía y la muerte celular. IP: yoduro de propidio. Barra = 50 μm .

La Figura 21 muestra la intensidad de fluorescencia del color verde correspondiente a la anexina V y rojo correspondiente al yoduro de propidio en la maduración de los ovocitos después del cultivo *in vitro*. Se encontraron diferencias significativas ($P = 0.0057$) con respecto a la anexina V entre el medio MM1 (51.95 ± 33.23) por ciento y MM2 (12.95 ± 2.34) por ciento. Por otra parte, la intensidad de fluorescencia con respecto al yoduro de propidio entre MM1 y MM2 fue de 16.57 ± 6.98 por ciento y 15.81 ± 3.06 por ciento respectivamente. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($P = 0.8124$) entre los grupos experimentales.

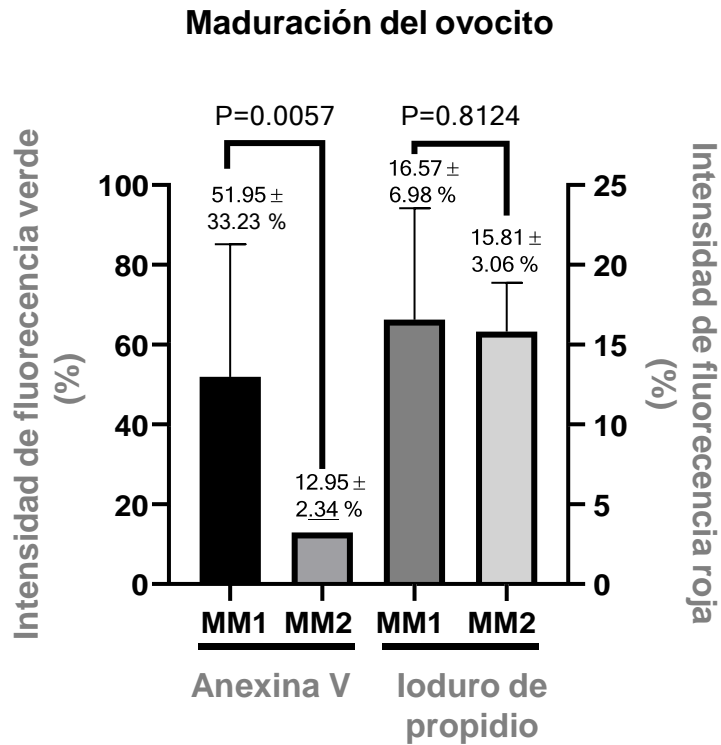


Figura 21. Intensidad de fluorescencia de ovocitos madurados in vitro utilizando dos medios de maduración; MM1 y MM2

Presentan diferencias significativas ($P = 0.0057$) utilizando la tinción de Anexina V. Mientras que la tinción con yoduro de propidio no mostró diferencias significativas ($P = 0.8124$) entre los dos grupos experimentales.

4.1.5. Concentración de E2, P4, T2 y AMH en el líquido folicular

Las concentraciones de E2 (Figura 22) en el líquido folicular según el diámetro del folículo fueron: para folículos de 1 - 2 mm (3426.85 ± 115.84 pg/mL), para folículos de 2 - 3 mm (3346.19 ± 107.81 pg/mL), para 3 - 4 mm (3545.80 ± 108.73 pg/ml), 4 - 5 mm (3458.86 ± 23.38 pg/mL), 5 - 6 mm (3628.38 ± 73.46 pg/mL), 6 - 7 mm (3454.46 ± 99.18

pg/mL), 7 - 8 mm (3833.57 ± 105.50 pg/mL), 8 - 9 mm (3569.59 ± 128.27 pg/mL), 9 - 10 mm (3543.85 ± 143.58 pg/mL), 15 - 16 mm (1243.85 ± 473.91 pg/ mL) y para folículos de 24 - 25 mm (1217.93 ± 296.58 pg/mL). Los valores mínimo y máximo fueron 1217.93 ± 296.58 pg/mL y 3833.57 ± 105.50 pg/mL respectivamente, siendo la media 3115.34 ± 940.35 pg/mL. Se encontraron algunas diferencias significativas entre las concentraciones de E2 de los diferentes diámetros de folículo (Figura 23).

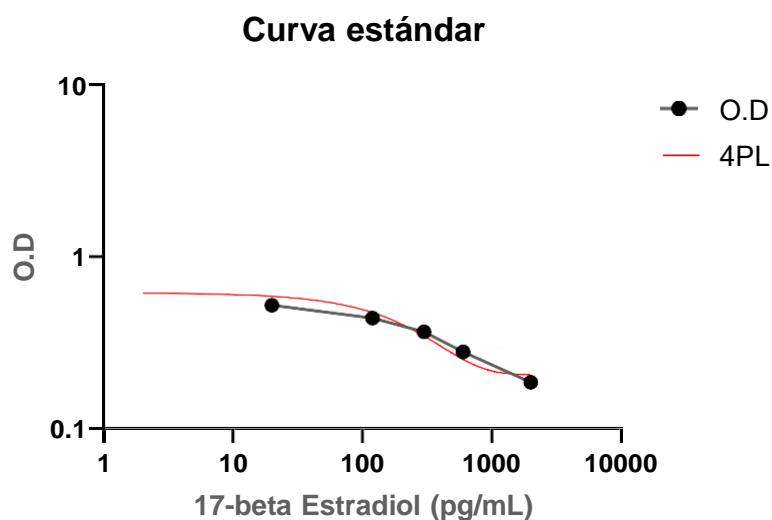


Figura 22. Curva estándar E2

Esta curva estándar de concentración de 17-beta estradiol frente a la densidad óptica se utiliza para estimar las concentraciones de muestras de líquido folicular de los folículos presentes en los ovarios de alpaca. Para el ajuste de la curva se utilizó el modelo de Regresión Logística de Cuatro Parámetros, obteniendo un $R^2 = 0.996$. Los parámetros fueron $a = 0.690$, $b = 0.335$, $c = 6471.603$ y $d = -0.573$. Los resultados se presentan en unidades de pg/mL. E2: estradiol, O.D: densidad óptica y 4PL: cuatro parámetros logísticos.

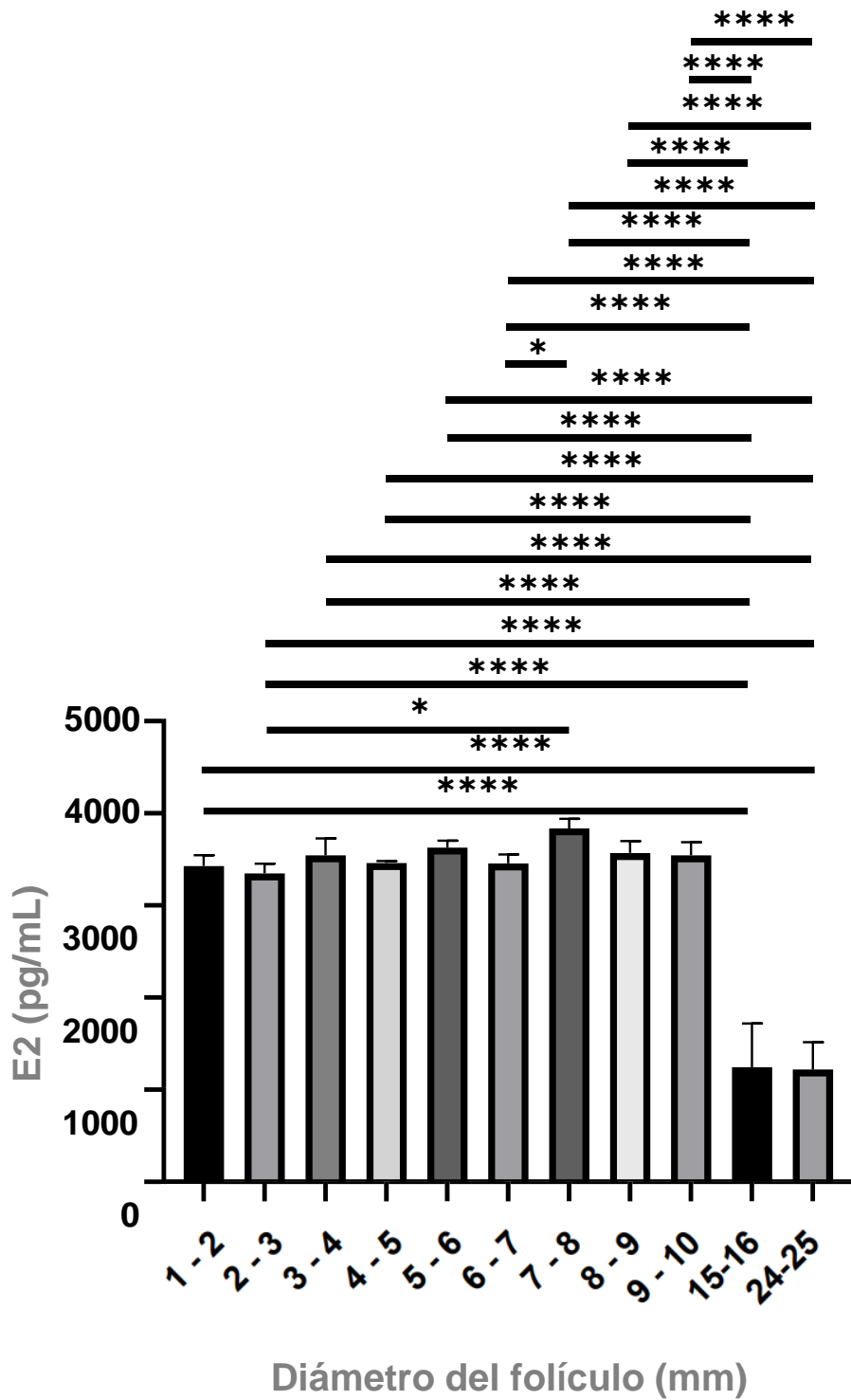


Figura 23. Concentración de E2 en líquido folicular

Los valores mínimo y máximo fueron 1217.93 ± 296.58 pg/mL y 3833.57 ± 105.50 pg/mL respectivamente, siendo la media 3115.34 ± 940.35 pg/mL. Diferencias significativas; *: $0.01 < P < 0.05$, *****: $P < 0.0001$. E2: estrógeno.

Las concentraciones de P4 (Figura 24) en el líquido folicular según el diámetro del folículo fueron: para folículos de 1 - 2 mm (1152.82 ± 1314.47 pg/mL), 2 - 3 mm (829.38 ± 0.00 pg/mL), 3 - 4 mm (747.33 ± 479.83 pg/mL), 4 - 5 mm (586.21 ± 346.47 pg/mL), 5 - 6 mm (559.11 ± 0.00 pg/mL), 6 - 7 mm (1014.55 ± 757.43 pg/mL), 7 - 8 mm (574.05 ± 134.46 pg/mL), 8 - 9 mm (1647.07 ± 1193.55 pg/mL), 9 - 10 mm (559.11 ± 0.00 pg/mL), 15 - 16 mm (146.49 ± 0.00 pg/mL) y para folículos de 24 - 25 mm (1285.75 ± 947.68 pg/mL). Los valores mínimo y máximo fueron 146.49 ± 0.00 pg/mL y 1647.07 ± 1193.55 pg/mL respectivamente, siendo la media 827.45 ± 419.44 pg/mL. No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de P4 de los diferentes diámetros de folículo (Figura 25).

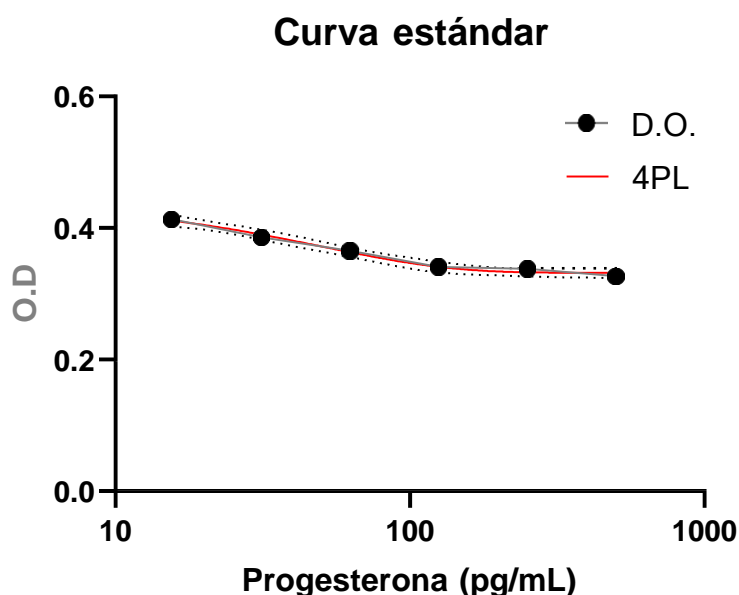


Figura 24. Curva estándar de P4

Esta curva estándar de concentración de progesterona frente a densidad óptica se utiliza para estimar las concentraciones de muestras de líquido folicular de los folículos presentes en los ovarios de alpaca. Para el ajuste de la curva se utilizó el modelo de Regresión Logística de Cuatro Parámetros, obteniendo un $R^2 = 0.993$. Los parámetros fueron $a = 0.482$, $b = 0.973$, $c = 21.300$ y $d = 0.321$. Los resultados se presentan en unidades de pg/mL. P4: progesterona, O.D: densidad óptica y 4PL: cuatro parámetros logísticos.

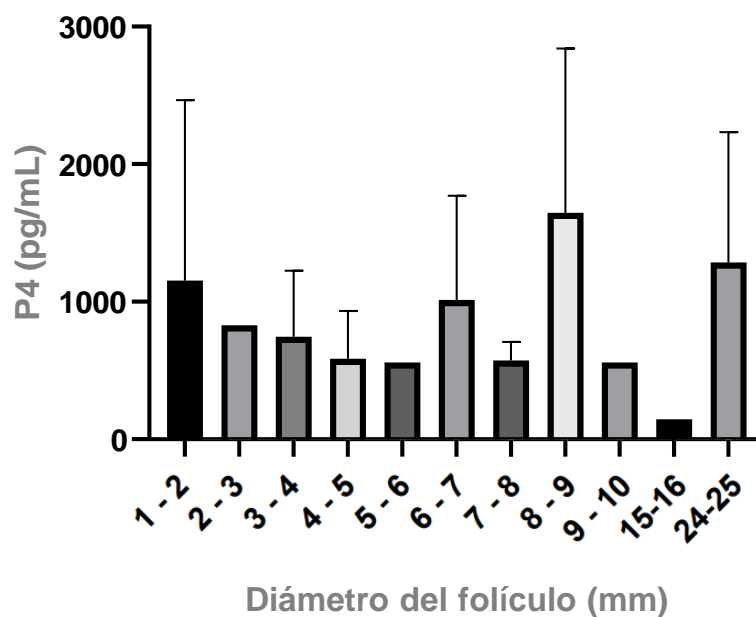


Figura 25. Concentración de P4 en líquido folicular

Los valores mínimo y máximo fueron $146.49 \pm 0,00$ pg/mL y $1647,07 \pm 1193.55$ pg/mL respectivamente, siendo la media 827.45 ± 419.44 pg/mL. No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de P4 en los diferentes diámetros de folículo. P4: progesterona.

Las concentraciones de T2 (Figura 26) en el líquido folicular según el diámetro del folículo fueron: para los folículos de 1 - 2 mm (4.75 ± 2.18 ng/mL), 2 - 3 mm (1.52 ± 1.82 ng/mL), 3 - 4 mm ($0.74 \pm 0,05$ ng/mL), 4 - 5 mm ($6.82 \pm 1,88$ ng/mL), 5 - 6 mm (4.42 ± 0.22 ng/mL), 6 - 7 mm (5.08 ± 0.86 ng/mL), 7 - 8 mm (13.17 ± 6.41 ng/mL), 8 - 9 mm (12.27 ± 2.13 ng/mL), 9 - 10 mm (15.80 ± 0.62 ng/mL), 15 - 16 mm (0.00 ± 0.00 ng/mL) y 24 - 25 mm (0.10 ± 0.03 ng/mL). Los valores mínimo y máximo fueron 0.00 ± 0.00 ng/mL y 15.80 ± 0.62 ng/mL respectivamente, con un promedio de 5.88 ± 5.57 ng/mL. Algunas diferencias significativas fueron encontradas entre las concentraciones de T2 de los diferentes diámetros de folículos (Figura 27).

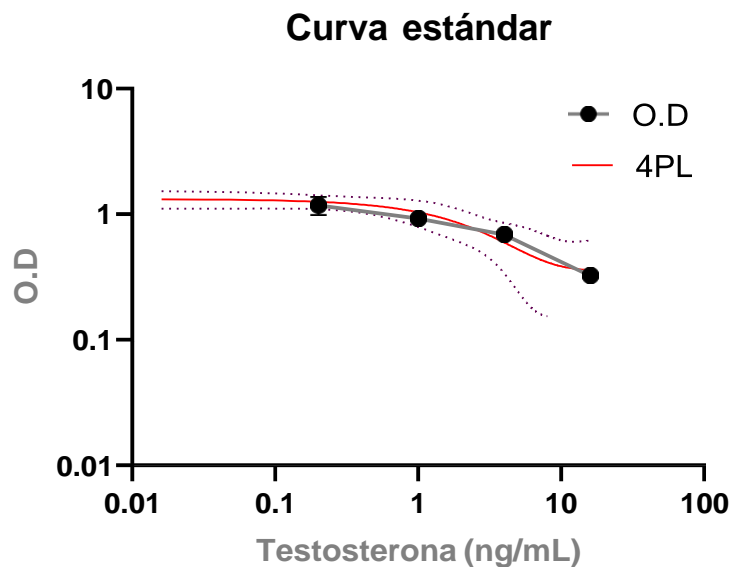


Figura 26. Curva estándar de T2

Esta curva estándar de concentración de testosterona frente a densidad óptica se utiliza para estimar las concentraciones de muestras de líquido folicular de los folículos presentes en los ovarios de alpaca. Para el ajuste de la curva se utilizó el modelo de Regresión Logística de Cuatro Parámetros, obteniendo un $R^2 = 0.999$. Los parámetros fueron $a = 1.450$, $b = 0.407$, $c = 40.086$ y $d = -1.302$. Los resultados se presentan en unidades de ng/mL. T2: testosterona, O.D: densidad óptica y 4PL: logística de cuatro parámetros.

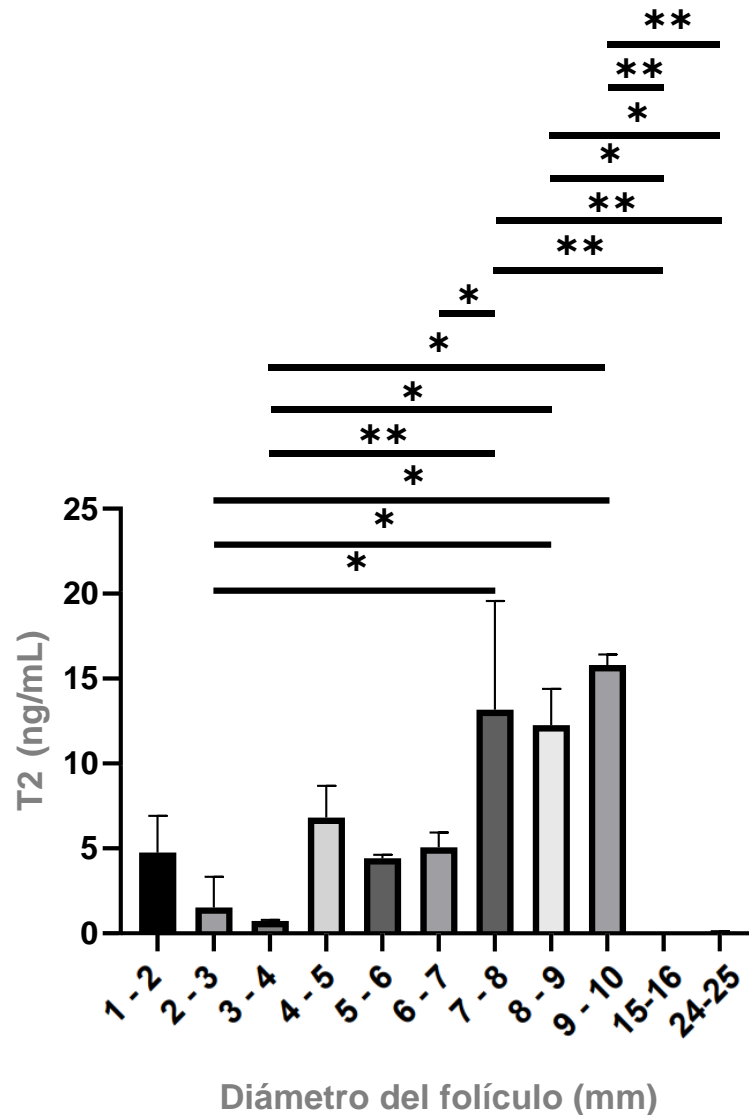


Figura 27. Concentración de T2 en líquido folicular

Los valores mínimo y máximo fueron 0.00 ± 0.00 ng/mL y 15.80 ± 0.62 ng/mL respectivamente, siendo el promedio 5.88 ± 5.57 ng/mL. Diferencias significativas; *: $0.01 < P < 0.05$, **: $0.001 < P < 0.01$. T2: testosterona.

Las concentraciones de AMH (Figura 28) en el líquido folicular según el diámetro del folículo fueron. Para folículos de 2 - 3 mm (0.79 ± 0.00 ng/mL), 3 - 4 mm (0.55 ± 0.00 ng/mL), 4 - 5 mm (1.93 ± 1.45 ng/mL), 5 - 6 mm (1.66 ± 0.54 ng/mL), 6 - 7 mm (1.06 ± 0.58 ng/mL), 7 - 8 mm (0.68 ± 0.41 ng/mL), 8 - 9 mm (0.81 ± 0.74 ng/mL), 9 - 10 mm (1.71 ± 0.03 ng/ml), 15 - 16 mm (0.85 ± 0.58 ng/ml) y 24 - 25 mm (0.98 ± 1.18) ng/mL. Los valores mínimo y máximo fueron 0.55 ± 0.00 ng/mL y 1.93 ± 1.45 ng/mL respectivamente,

siendo el promedio 1.10 ± 0.48 ng/mL. No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de AMH de los diferentes diámetros de folículo (Figura 29).

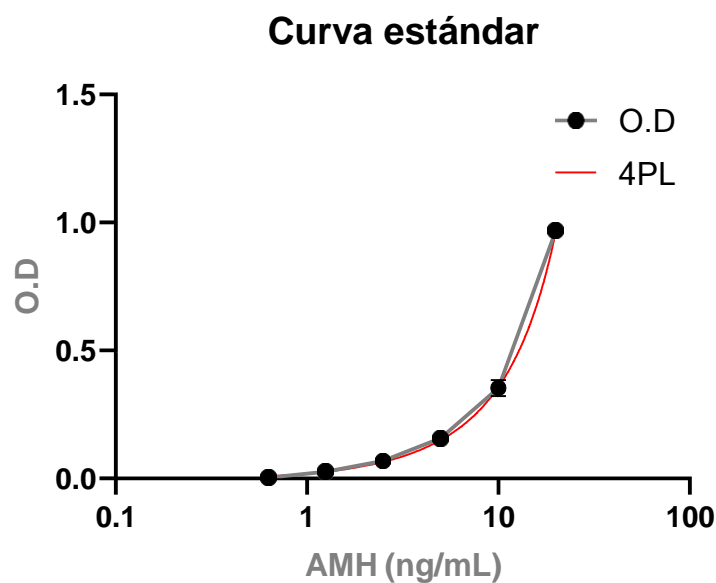


Figura 28. Curva estándar de AMH

Esta curva estándar de concentración antimülleriana frente a densidad óptica se utiliza para estimar las concentraciones de muestras de líquido folicular de los folículos presentes en los ovarios de alpaca. Para el ajuste de la curva se utilizó el modelo de Regresión Logística de Cuatro Parámetros, obteniendo un $R^2 = 0.999$. Los parámetros fueron $a = 0.008$, $b = 1.418$, $c = 250195.731$ y $d = 618667.979$. Los resultados se presentan en unidades de ng/mL. AMH: hormona antimülleriana, D.O.: densidad óptica y 4PL: logística de cuatro parámetros.

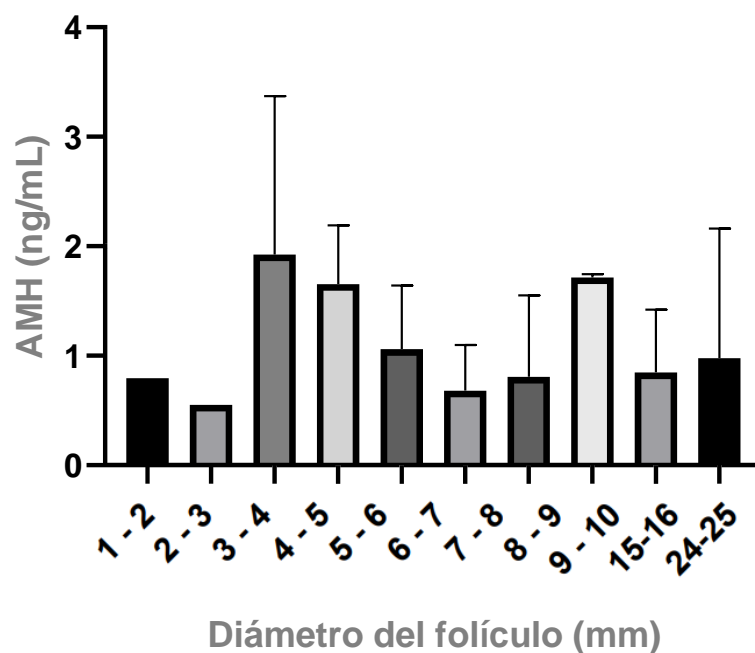


Figura 29. Concentración de AMH en líquido folicular

Los valores mínimo y máximo fueron 0.55 ± 0.00 ng/mL y 1.93 ± 1.45 ng/mL respectivamente, siendo el promedio 1.10 ± 0.48 ng/mL. No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de AMH en los diferentes diámetros de folículo. AMH: hormona antimülleriana.

4.1.6. Correlaciones entre las concentraciones de hormonas E2, P4, T2 y AMH en el líquido folicular

Las correlaciones entre las concentraciones de hormonas en el líquido folicular fueron positivas entre E2 y P4 ($r = 0.099$; $P = 0.772$), E2 y T2 ($r = 0.574$; $P = 0.065$), E2 y AMH ($r = 0.180$; $P = 0.618$), P4 y T2 ($r = 0.091$; $P = 0.790$), T2 y AMH ($r = 0.292$; $P = 0.413$). Hubo una correlación negativa entre P4 y AMH ($r = -0.265$; $P = 0.413$). En el caso de E2 y P4, E2 y AMH, P4 y T2 presentan correlaciones muy bajas ($0 < r < \pm 0.2$) en el caso de T2 y AMH, P4 y AMH presentan correlaciones bajas ($\pm 0.2 < r < \pm 0.4$). Solo en el caso de E2 y T2 existe una correlación moderada ($\pm 0.4 < r < \pm 0.6$).

4.1.7. Relación entre la concentración de hormonas E2/P4 y E2/T2 en el líquido folicular

La relación de las concentraciones de E2/P4 y E2/T2 no se encontraron diferencias significativas según el diámetro del folículo. Sin embargo, se observa una relación entre niveles altos del cociente E2/P4 y niveles bajos del cociente E2/T2 en folículos con

diámetros de 4 – 5 mm (E2/P4: 5.90; E2/T2: 0.51), 5 – 6 mm (E2/P4: 6.49; E2/T2: 0.82), 6 – 7 mm (E2/P4: 3.40; E2/T2: 0.68), 7 – 8 mm (E2/P4: 6.68; E2/T2: 0.29) , 8 – 9 mm (E2/P4: 2.17; E2/T2: 0.29) y 9 – 10 mm (E2/P4: 6.34; E2/T2: 0.22) (Figura 30).

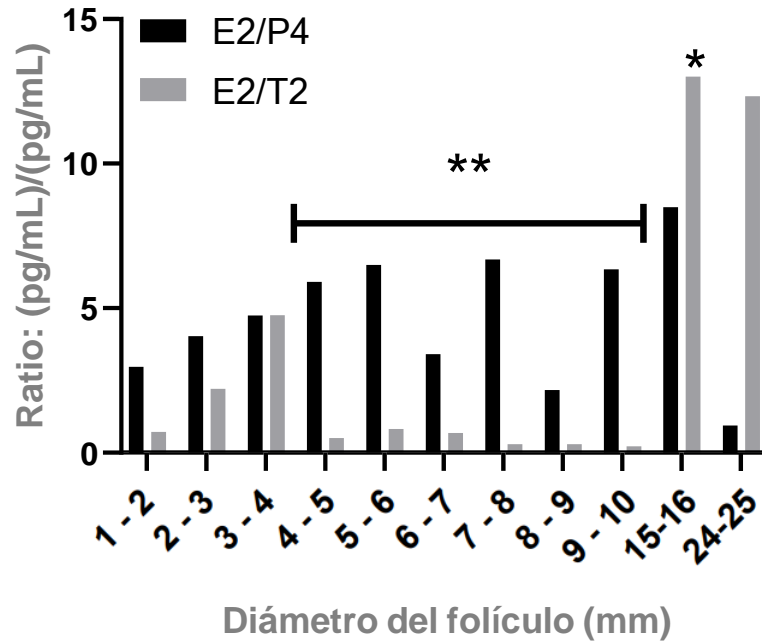


Figura 30. Relación E2/P4 y E2/T2 en el líquido folicular

No se encontraron diferencias significativas entre los diámetros foliculares de las relaciones E2/P4 y E2/T2 ($P > 0.05$). La relación entre niveles altos de E2/P4 y bajos de E2/T2 se encontró en folículos con diámetros de 4 - 5 mm (E2/P4: 5.90; E2/T2: 0.51), 5 - 6 mm (E2/P4: 6.49 ; E2 /T2: 0.82), 6 - 7 mm (E2/P4: 3.40; E2/T2: 0.68), 7 - 8 mm (E2/P4: 6.68; E2/T2: 0.29), 8 - 9 mm (E2/P4 : 2.17; E2/T2: 0.29) y 9 - 10 mm (E2/P4: 6.34; E2/T2: 0.22). E2: estrógeno, P4: progesterona, T2: testosterona. *: relación E2/T2 >13, **: probables folículos viables para cultivo in vitro.

4.2. DISCUSIÓN

4.2.1. Evaluación la influencia de los medios de maduración *in vitro* en la producción de ovocitos de alpaca competentes

Los resultados del presente estudio son los primeros en describir la determinación de la competencia ovocitaria según los cambios nucleares, citoplasmáticos, apoptosis y morfométricos en ovocitos de alpaca durante la maduración *in vitro*, comparando dos medios de cultivo. El período de maduración *in vitro* fue de 40 horas para los dos grupos experimentales. Este valor se tomó de acuerdo con trabajos previos sobre maduración *in vitro* en alpacas (Condori *et al.* 2011; Huanca *et al.* 2014; Miragaya *et al.* 2006) y camellos (Nowshari 2005; Saadeldin *et al.* 2017), lo que resultó en altas tasas de ovocitos en metafaseII (MII), que se contrastó con nuestros resultados. Además, está estrechamente relacionado con las altas tasas de formación de blastocistos tras la fecundación *in vitro*. La utilización de tiempos más largos genera una mayor tasa de ovocitos degenerados. La recuperación de ovocitos es de gran importancia para realizar estudios avanzados en biotecnología reproductiva. Son pocos los mataderos en el mundo que benefician alpacas, siendo la región de Puno, donde se encuentra la mayor población de alpacas en el Perú, y el distrito de Nuñoa el lugar con mayor beneficio. Sin embargo, se dispone de material animal limitado para experimentación en laboratorio. Es por ello, que utilizamos dos procedimientos secuenciales de recolección de ovocitos para obtener el mayor rendimiento posible, que consiste primero en la aspiración de los folículos utilizando jeringas de 1 mL mayores de 3 mm y luego la disección de los ovarios para obtener folículos menores de 1 mm. La aspiración realizada solo con jeringa o bomba de vacío (comúnmente aplicada en otras especies domésticas) (Gordon, 2003), muestra una baja tasa de recuperación en alpacas. Esto se atribuye principalmente a la estructura de los ovarios de las alpacas y los camellos (Nowshari 2005).

Las incubadoras utilizadas para cultivo *in vitro* recrean las condiciones *in vivo* en el proceso de maduración, fecundación y desarrollo embrionario. Se han diseñado diferentes estrategias tecnológicas que varían en función de la tasa de embriones obtenidos y del factor económico (Suzuki *et al.* 1999). En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se demostró que no existen diferencias significativas entre una incubadora convencional y una portátil en la obtención de embriones bovinos (Pérez 2019). Este último utiliza gránulos efervescentes como aporte de CO₂ (5%) y un baño termostático como regulador de temperatura (38.5 °C). Además, en condiciones de altura, las fluctuaciones en la temperatura

ambiente varían de -7 a 18 °C (Sanabria & Lhomme 2013). Estos cambios extremos de temperatura hacen que el uso de incubadoras convencionales sea menos viable que las incubadoras con baño termostático. En nuestra experiencia, la incubadora portátil responde mucho mejor a los cambios bruscos de temperatura ambiental.

En nuestra investigación para determinar la competencia ovocitaria después de la maduración *in vitro* según maduración nuclear y citoplasmática, apoptosis y morfométrica, se utilizaron dos medios de cultivo (MM1 (Tríbulo *et al.* 2019) y MM2 (Saadeldin *et al.* 2019)). En la mayoría de los estudios realizados en alpacas, generalmente se utiliza MM1 para la maduración, sin embargo, hasta el momento no se sabía si era el medio de maduración más eficiente. Según nuestros resultados, MM2 tiene un mayor rendimiento que MM1 tanto en maduración nuclear (46.08 ± 5.90 por ciento para MM1 y 54.65 ± 3.0 por ciento para MM2) y maduración citoplasmática (67.78 ± 4.50 por ciento para MM1 y 77.61 ± 3.58 por ciento para MM2), aunque solo se encontraron diferencias significativas en la maduración citoplasmática. Por otro lado, nuestros resultados están dentro del rango reportado por otros investigadores. En alpacas, maduración nuclear de 65.8 ± 8.1 por ciento a las 38 h (Huanca *et al.* 2010), 65.1 ± 5.7 por ciento a las 32h por aspiración con jeringa (Ruiz *et al.* 2017), 75.3 ± 11.9 por ciento a las 42 h (Huanca *et al.* 2014), 57.6 por ciento utilizando folículos mayores de 2 mm, suplementado con suero fetal bovino al 10 por ciento (v/v) y animales mayores de 11 años (Leisinger *et al.* 2014), 64.9 ± 8.1 por ciento, en presencia de 0.5 µg/mL de FSH durante 42 h (Condori *et al.* 2011), 46.9 por ciento usando 0.25 µg/mL, 2.5 µg/mL y 15 UI/mL (Ulises *et al.* 2019), 74.2 por ciento, 2 UI/mL de eCG y 10 UI/mL de hCG (Pacompiá 2017). En llamas, 70.53 ± 3.75 por ciento, 42 horas (Ayuque & Justiniano 2013). En dromedarios, $81.6 \pm 0,8$ por ciento suplementado con FCS 10 por ciento (v/v) a las 30 - 32 horas (Moulavi & Hosseini 2019), 61 por ciento utilizando medio TCM-199, cultivado a las 40-42 h, ovocitos de matadero y utilizando el método de disección (Nowshari 2005), 71 por ciento a las 42 h (Kafi *et al.* 2005). En alpacas aún no se reportan estudios de maduración citoplasmática, siendo el primero este estudio. Sin embargo, en bovino se han obtenido tasas del 80.3 por ciento (Argudo *et al.* 2020) y 77.75 por ciento aspirando folículos de 4 a 8 mm utilizando OPU (Ayala *et al.* 2018). Además, en este mismo estudio no se encontraron diferencias significativas en animales cony sin tratamiento de superovulación.

Según los resultados en el análisis de apoptosis, MM1 tiene un porcentaje mayor que MM2 tanto en análisis de anexina V (51.95 ± 33.23 por ciento para MM1 y 12.95 ± 2.34 por ciento para MM2) como de yoduro de propidio (16.57 ± 6.98 por ciento para MM1 y 15.81 ± 3.06

por ciento para MM2), aunque solo se encontraron diferencias significativas en la anexina V. En alpacas, hasta la fecha no se han reportado estudios de apoptosis en ovocitos. En cerdos se encontraron resultados de 20.07 ± 2.52 por ciento para la anexina V (Jiang *et al.* 2021). En búfalos, se encontraron resultados de 9.83 a 10.42 por ciento para la anexina V usando diferentes concentraciones de leptina como tratamiento (Khaki1 *et al.* 2014). Aún se requieren más estudios sobre la apoptosis temprana y tardía en ovocitos de alpaca para corroborar nuestros resultados y crear un umbral permisible de porcentajes máximos y mínimos de concentración de anexina V y yoduro de propidio.

Según nuestros estudios morfométricos realizados en ovocitos madurados con dos medios de maduración, para el caso de diámetro del ovocito se obtuvieron $136.14 \pm 15.24 \mu\text{m}$ y $133.42 \pm 14.56 \mu\text{m}$, espesor de zona pelúcida $16.73 \pm 4.98 \mu\text{m}$ y $16.84 \pm 3.96 \mu\text{m}$, área del espacio perivitelino $8686.18 \pm 3016.88 \mu\text{m}^2$ y $11018.91 \pm 2465.40 \mu\text{m}^2$ usando MM2 y MM1 respectivamente. No se encontraron trabajos de referencia en alpacas. Sin embargo, en camélidos dromedarios existe un estudio morfométrico con diámetro de ovocito $145.93 \pm 0.85 \mu\text{m}$ y $141 \pm 0.87 \mu\text{m}$, espesor de zona pelúcida $10.52 \pm 0.31 \mu\text{m}$ y $10.76 \pm 0.38 \mu\text{m}$, para ovocitos con primer cuerpo polar y degenerados respectivamente (Saadeldin *et al.* 2017). La comparación de estos estudios muestra que los ovocitos con mayor diámetro y una zona pelúcida más delgada se relacionan con ovocitos de calidad y una alta tasa de fecundación (Loutradis *et al.* 1999), obteniendo mejores resultados con el MM2. En el caso del área del espacio perivitelino, se sabe que una mayor área se relaciona con una baja tasa de fecundación (Rienzi *et al.* 2008), se encontraron mejores resultados de calidad ovocitaria utilizando MM2.

Las diferencias entre los medios de maduración se deben a su composición y concentración de los reactivos utilizados en cada uno de los medios. En cuanto a la concentración de pFSH, fué de $25 \mu\text{g/ml}$ frente a $10 \mu\text{g/mL}$, 17β -estradiol de $2 \mu\text{g/mL}$ frente a $1 \mu\text{g/mL}$ para MM1 y MM2 respectivamente. Sin embargo, MM1 no contiene hCG ni EGF en su composición, siendo estas moléculas cruciales para obtener ovocitos competentes en alpacas. La hCG participa en el mecanismo molecular de la maduración (Humaidan & Alsbjerg 2014) y el EGF participa en el mecanismo molecular del crecimiento de los ovocitos (Richani & Gilchrist 2018). Por otro lado, la administración de cisteamina e insulina en MM2 ayuda en la desintoxicación celular (Karadjole *et al.* 2006) y en el metabolismo energético del ovocito (Purcell *et al.* 2012), respectivamente. Recomendamos realizar más estudios utilizando estos reactivos de forma individual y colectiva, así como suplementar con citocinas como factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento similar a la insulina, factor inhibidor de

leucemia, entre otros. Al mismo tiempo realizar estudios de biología molecular para dilucidar las rutas de señalización de dichas moléculas. Asimismo, se recomienda realizar estudios complementarios con predictores de calidad ovocitaria a nivel molecular.

4.2.2. Determinación de las concentraciones y proporciones de hormonas esteroides sexuales y hormona antimülleriana en el líquido folicular de alpacas según el diámetro folicular

Los resultados de este estudio determinan por primera vez las concentraciones de estrógeno, progesterona, testosterona y hormona antimülleriana en el líquido folicular para diferentes diámetros en el desarrollo folicular en alpacas dentro de un mismo estudio.

Para el análisis de hormonas reproductivas se utilizaron kits Elisa de diferentes proveedores. Cabe mencionar que aún existen diferencias en la capacidad de detección y medición de algunas pruebas comerciales sobre concentraciones en fluidos fisiológicos. En el caso de las alpacas, aún no hay disponibilidad en el mercado de Kits Elisa con anticuerpos específicos para detectar diferentes metabolitos en camélidos sudamericanos, por lo que se generan sesgos a la hora de determinar las concentraciones reales de estos metabolitos al utilizar kits que han sido diseñados para otras especies. Se utilizó el modelo de Regresión Logística de Cuatro Parámetros para realizar los cálculos para la determinación de la concentración de hormonas en todos los Kits Elisa.

En las gónadas, los esteroides sexuales desempeñan un papel central en la regulación de la espermatogénesis, la ovogénesis, la foliculogénesis y la esteroidogénesis. En los mamíferos, la biosíntesis de estrógenos es catalizada por el proceso de aromatización de los andrógenos por la enzima aromatasa P450 (Carreau *et al.* 2011). En la actualidad existen pocos estudios sobre la determinación de la concentración de estradiol en el líquido folicular, puesto que, es un trabajo mucho más específico en comparación con el análisis en muestras sanguíneas. Según nuestros resultados para la determinación de E2 en el líquido folicular se obtuvieron valores mínimos y máximos de 1217.93 ± 296.58 pg/mL y 3833.57 ± 105.50 pg/mL respectivamente, siendo la media de 3115.34 ± 940.35 pg/mL. En estudios realizados en suero sanguíneo de alpacas hembras realizada por el Centro de Diagnóstico de Salud Animal (Semevolos *et al.* 2013), se obtuvieron concentraciones de 18.0 - 31.3 pg/mL en suero sanguíneo, no se especifica el método de detección. Otro estudio en plasma sanguíneo en animales después del parto, muestra concentraciones de 2.17 - 6.53 pg/mL, se utilizó la

técnica de inmunoensayo de luminiscencia de la compañía Kodak Clinical Diagnostics (Aba *et al.* 1998). En un estudio sobre los efectos del comportamiento de apareamiento y el estado ovárico folicular de las alpacas hembras en la concepción, determinó los niveles plasmáticos de E2 de 0.32 - 9.96 pg/mL, se utilizó el kit RIA de Biochem Immunosystems Inc., (Vaughan *et al.* 2003). Por su parte (Asmat 2016) para determinar la relación entre los estadios foliculares y los niveles de estradiol intrafolicular en alpacas utilizó el Kit RIA de la Empresa Dia Source en el líquido folicular de diferentes diámetros foliculares, se reportaron los siguientes niveles de estradiol correspondientes: para folículos de 2 - 4 mm (132 ± 11.3 ng/mL), para 5 - 6 mm (108 ± 54 ng/mL), para 7 - 8 mm (566.9 ± 296.5 ng/mL), para 9 - 10 mm (367.5 ± 189.9 ng/mL), para más de 10 mm (234.8 ± 54.3 ng/mL) y para folículos atrésicos 4.2 ± 2.8 ng/mL. En un estudio realizado por (Pacheco *et al.* 2019) las variaciones de la composición bioquímica del líquido folicular de alpaca según el estado de crecimiento del folículo ovárico, en el fluido folicular y utilizando el Kit Elisa de la Empresa AccuDiag, reportaron concentraciones de 0.8 ± 0.1 ng/mL, 1.91 ± 0.18 ng/mL y 2.39 ± 0.15 ng/mL según crecimiento folicular con diámetros < 4 mm, 5 - 7 mm y > 7 mm, respectivamente. Otro estudio que usó suero sanguíneo y el kit RIA de Diagnostic Products Corporation en muestras de animales preñados y no preñados, informó concentraciones de estradiol de 0.85 ± 0.59 pg/mL y 0.68 ± 0.47 pg/mL, respectivamente (Díaz 2010). De todos los estudios mencionados anteriormente, la concentración en muestras de suero varía de 0.32 pg/mL a 31.3 pg/mL mientras que en el líquido folicular las concentraciones varían de 0.8 ng/mL a 566.9 ng/mL. En nuestro estudio las concentraciones obtenidas están dentro del rango con una media de 3.12 ng/mL. Cabe mencionar que según nuestros resultados existe una caída en la concentración de E2 en folículos con diámetros mayores a 1.5 mm. Muchos factores pueden estar involucrados en los cambios en las concentraciones de E2, desde la técnica utilizada para la detección y medición, hasta los aspectos fisiológicos del animal.

Las concentraciones de progesterona en el líquido folicular actualmente se han correlacionado con la calidad del ovocito, incluso el cociente E2/P4 es mejor indicador de la maduración del ovocito que el diámetro del folículo (Mendoza *et al.* 1999), además del papel conocido como predictores de implantación y embarazo (Kobayashi *et al.* 1991; Vanluchene *et al.* 1991). En la actualidad, no existe ningún estudio relacionado con la determinación de concentraciones de P4 en líquido folicular en alpacas. Sin embargo, se presentan estudios sobre muestras de sangre. En el análisis con el kit RIA de Diagnostic Products Corporation, se obtuvieron concentraciones de P4 de 0.32 ng/mL y 3.5 ng/mL sin

cuerpo lúteo y con cuerpo lúteo, respectivamente (Adams et al., 2005). En los análisis realizados por el Centro de Diagnóstico en Salud, obtuvieron concentraciones entre 0,04 – 0.82 ng/mL (Semevolos *et al.* 2013). Después del parto, se determinaron concentraciones que oscilaron entre 1.26 y 8.80 ng/mL utilizando el kit RIA de Diagnostic Products Company (Aba *et al.* 1998). En alpacas gestantes y no gestantes se obtuvieron concentraciones de 2.94 ± 0.11 ng/mL y 0.35 ± 0.04 ng/mL, respectivamente, utilizando el Kit Elisa de Biolab (Volkery *et al.* 2012). Con el kit RIA de Diagnostic Product Company, se obtuvieron concentraciones de 0.03 ng/mL, 2.53 ng/mL, 0.47 ng/mL y 0.08 ng/mL para muestras obtenidas de alpacas no preñadas, preñadas, parto y posparto, respectivamente (Raggi *et al.* 1999). En presencia del cuerpo lúteo, se obtuvieron 1.4 ± 0.2 ng/ml utilizando el kit RIA de Siemens (Norambuena *et al.* 2017). Según los estudios mencionados, las concentraciones de progesterona varían de 0.04 ng/mL a 8.80 ng/mL. En nuestro estudio se obtuvieron concentraciones mínimas y máximas en el líquido folicular de 146.49 pg/mL y 1647.07 pg/mL respectivamente, siendo la media de 827.45 pg/mL (0,83 ng/mL). Aún se requieren más estudios relacionados con la concentración de P4 en el líquido folicular teniendo en cuenta la cantidad de tejido del cuerpo lúteo en el ovario, puesto que, se sabe que los cuerpos lúteos son productores de P4 y que estos podrían afectar las concentraciones en el líquido folicular en las diferentes etapas de crecimiento.

Las altas concentraciones de testosterona en el líquido folicular se han asociado con una baja calidad de los ovocitos, y en particular, con ovocitos que muestran baja ratio en fertilización (Botero-Ruiz *et al.* 1984). A su vez, una relación E2/T2 baja puede asociarse con atresia folicular temprana (López & Sánchez 2013). Actualmente en alpacas hembras, no existe ningún estudio sobre la determinación de concentraciones de T2 en líquido folicular. Sin embargo, se presentan estudios sobre muestras de sangre. Con el kit RIA fabricado en el Laboratorio de Endocrinología de la Universidad de California, se obtuvieron 11.7 – 62.1 pg/mL (Gilbert *et al.* 2006). Mientras que los resultados obtenidos por el Centro de Diagnóstico de Salud Animal fueron 0.0 - 0.01 ng/mL (Semevolos *et al.* 2013). Según los dos estudios mencionados las concentraciones varían de 0.0 ng/mL a 0.06 ng/mL. En nuestro estudio en el líquido folicular se obtuvieron valores mínimos y máximos de 0.00 ± 0.00 ng/mL y 15.80 ± 0.62 ng/mL respectivamente, siendo la media de 5.88 ± 5.57 ng/mL. Cabe mencionar que según nuestros resultados existe una caída en la concentración de T2 en folículos con diámetros mayores a 1.5 mm. Los niveles de testosterona en nuestros resultados son superiores a los estudios reportados en suero sanguíneo, aún se requieren más

estudios para determinar la concentración de T2 en el líquido folicular para poder corroborar nuestros resultados y determinar el umbral máximo de T2.

La hormona antimülleriana además de su papel más conocido en la diferenciación sexual del embrión (Josso *et al.* 2006), también tiene un papel importante como marcador molecular de la reserva ovárica (Gamarra *et al.* 2014). Esta última función permite predecir la respuesta del pool de folículos, teniendo mayor aplicabilidad a la hora de realizar tratamientos de superovulación. A la fecha, no existen estudios sobre la determinación de la concentración de AMH en el líquido folicular en hembras de alpaca. Sin embargo, se presentan estudios sobre muestras de sangre. Con el kit Elisa de AnshLab, se reportan los siguientes resultados; 370.0 – 3129.0 pg/mL (Céliz 2017) y 299.0 – 2573.0 pg/mL (Zirena 2019). En nuestro estudio en el líquido folicular los valores mínimo y máximo obtenidos fueron 0.55 ± 0.00 ng/mL y 1.93 ± 1.45 ng/mL respectivamente, siendo la media de 1.10 ng/mL (1100 pg/mL). Nuestros resultados están dentro de los niveles de los estudios reportados. Sin embargo, aún se requieren más estudios sobre las concentraciones de AMH en el líquido folicular de las alpacas.

En la actualidad, no existe un criterio bien establecido para el uso de ovocitos según el diámetro folicular en alpacas. Muchos investigadores que se dedican al cultivo *in vitro* no tienen en cuenta el diámetro del folículo. Puesto que, en primera instancia, la finalidad es rescatar todos los ovocitos independientemente de que sean viables o no. Habitualmente, los criterios de evaluación se dan tras la extracción de los ovocitos del folículo, la maduración *in vitro* y la fecundación hasta la formación del embrión. Algunas investigaciones sugieren que la autonomía del ovocito para el cultivo *in vitro* se adquiere cuando existe una relación E2/P4 alta y una relación E2/T2 baja en los folículos (López & Sánchez 2013). De acuerdo con nuestra investigación, proponemos que existe una alta probabilidad de obtener ovocitos de alpaca viables para cultivo *in vitro* utilizando diámetros de folículo que van desde 4 mm hasta 10 mm.

V. CONCLUSIONES

- El presente estudio muestra que MM2 presenta mejores resultados en la maduración citoplasmática, área del espacio perivitelino y anexina V. Sin embargo, la maduración nuclear, el diámetro del ovocito, el espesor de la zona pelúcida y tinción con yoduro de propidio no mostraron diferencias significativas entre los dos medios de cultivo. Esto se debería a que MM2 contiene en su composición factor de crecimiento epidérmico, gonadotropina coriónica humana, cisteamina e insulina que participan directa e indirectamente en la obtención de ovocitos competentes de alpacas.
- Los niveles de E2 en el líquido folicular se encuentran en el rango informado por otros investigadores. En folículos mayores de 15 mm, se reportan niveles bajos de E2 y T2. Las concentraciones de P4 y AMH en el líquido folicular en los diferentes diámetros del folículo no presentan diferencias significativas.
- En los análisis de correlación de Pearson entre E2 y P4, E2 y AMH, P4 y T2 se encuentran correlaciones muy bajas; mientras, T2 y AMH, P4 y AMH correlaciones bajas. Solo en el caso de E2 y T2 la correlación es moderada.
- Las proporciones E2/P4 y E2/T2 en el líquido folicular según los diámetros de los folículos sugieren que los ovocitos de folículos con diámetros que van de 4 mm a 10 mm son adecuados para su uso en protocolos de cultivo *in vitro*.
- Los animales de experimentación que se sacrificaron y cuyos ovarios se utilizaron para la aspiración folicular se encontraban en diferentes etapas de sus ciclos ováricos, por lo que los niveles hormonales informados corresponden a un determinado tamaño del folículo, no a una etapa específica del ciclo ovárico.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar la suplementación de diferentes concentraciones de factores de crecimiento, como la proteína morfogenética ósea, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, somatotropina bovina fetal, factor de diferenciación de crecimiento, factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento transformados, etc., al medio de cultivo MM2 para determinar su respuesta en el rendimiento de los ovocitos competentes de alpacas.
- Evaluar la suplementación de diferentes concentraciones de antioxidantes como ácido ascórbico, glutatión, retinol, α -tocoferol, polifenoles, carotenoides, etc., en el medio de cultivo MM2 para determinar su respuesta en el rendimiento de los ovocitos competentes de alpacas.
- Realizar nuevos ensayos utilizando predictores de calidad de ovocitos; morfológicos, celulares y moleculares antes, durante y después de su maduración *in vitro*.
- Continuar con los procesos de cultivo *in vitro*; fertilización *in vitro* y desarrollo embrionario, generando medios estandarizados y realizando seguimientos con predictores de calidad del cigoto hasta la obtención del blastocisto.
- Realizar investigaciones de genómica funcional, transcriptómica, proteómica, metabolómica e integración de las ómicas en la foliculogénesis de ovarios de alpacas *in vivo* e *in vitro* con la finalidad de entender los mecanismos moleculares que subyacen en la compleja interacción entre el ovocito, la célula de cúmulos, célula de la granulosa, células de la teca interna y externa, entre otras.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aba, M. A., Sumar, J., Kindahl, H., Forsberg, M., & Edqvist, L. E. 1998. Plasma concentrations of 15-ketodihydro-PGF(2 α), progesterone, oestrone sulphate, oestradiol-17 β and cortisol during late gestation, parturition and the early post partum period in llamas and alpacas. *Animal Reproduction Science*, 50(1–2), 111–121. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(97\)00084-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(97)00084-5)
- Adams, G. P., Ratto, M. H., Huanca, W., & Singh, J. 2005. Ovulation-Inducing Factor in the Seminal Plasma of Alpacas and Llamas. *Biology of Reproduction*, 73(3), 452–457. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.040097>
- Adhikary, A., Buschmann, V., Müller, C., & Sauer, M. 2003. Ensemble and single-molecule fluorescence spectroscopic study of the binding modes of the bis-benzimidazole derivative Hoechst 33258 with DNA. *Nucleic Acids Research*, 31(8), 2178–2186. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg308>
- Agarwal, A., Saleh, R. A., & Bedaiwy, M. A. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*, 79(4), 829–843. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04948-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04948-8)
- Ali, A., Benkhalifa, M., & Miron, P. 2006. In-vitro maturation of oocytes: Biological aspects. *Reproductive BioMedicine Online*, 13(3), 437–446. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61450-2](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61450-2)
- Argudo, D. E., Tenemaza, M. A., Merchán, S. L., Balvoa, J. A., Méndez, M. S., Soria, M. E., Galarza, L. R., Ayala, L. E., Hernández-Fonseca, H. J., Perea, M. S., & Perea, F. P. 2020. Intraovarian influence of bovine corpus luteum on oocyte morphometry and developmental competence, embryo production and cryotolerance. *Theriogenology*, 155, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.044>
- Asimakopoulos, B., Abu-Hassan, D., Metzen, E., Al-Hasani, S., Diedrich, K., & Nikolettos, N. 2008. The levels of steroid hormones and cytokines in individual follicles are not associated with the fertilization outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 90(1), 60–64. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.05.054>
- Asmat, M. Á. L. 2016. *Relación entre los Estadios Foliculares y los Niveles de Estradiol Intrafolicular en Alpacas Vicugna Pacos*. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Ayala, L., Samaniego, J., Nieto, P., Rodas, R., Dután, J., Calle, G., Murillo, Y., Vázquez, J., Argudo, D., & Perea, F. 2018. Competence of the oocyte obtained by ovum pick-up as evaluated by the bright cresyl blue test. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 29(2), 552–558.
- Ayunque, A., & Justiniano, E. C. 2013. *Evaluación de diferentes tiempos para la*

maduración nuclear de ovocitos de llamas (Lama glama) en el desarrollo de embriones producidos por fecundación in vitro.

- Baarends, W., Uilenbroek, J., P Kramer, J., Hoogerbrugge, E., van Leeuwen, A., Themmen, J., & Grootegoed. 1995. *Anti-Müllerian Hormone and Anti-Müllerian Hormone Type II Receptor Messenger Ribonucleic Acid Expression in Rat Ovaries during Postnatal Development, the Estrous Cycle, and Gonadotropin-Induced Follicle Growth*. 136(11), 4951–4962.
- Bachvarova, R. 1985. Gene expression during oogenesis and oocyte development in mammals. *Oogenesis*, 1, 453–524.
- Bachvarova, R., De Leon, V., & Spiegelman, I. 1981. Mouse egg ribosomes: Evidence for storage in lattices. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, Vol. 62, 153–164.
- Balakier, H. 2002. Morphological and cytogenetic analysis of human giant oocytes and giant embryos. *Human Reproduction*, 17(9), 2394–2401. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.9.2394>
- Behringer, R. R., Finegold, M. J., & Cate, R. L. 1994. Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell*, 79(3), 415–425. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90251-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90251-8)
- Ben-Rafael, Z., Meloni, F., Strauss, J. F., Blasco, L., Mastroianni, L., & Flickinger, G. L. 1987. Relationships between polypronuclear fertilization and follicular fluid hormones in gonadotropin-treated women. *Fertility and Sterility*, 47(2), 284–288. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)50007-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)50007-7)
- Bernhardt, M. L., Kim, A. M., O'Halloran, T. V., & Woodruff, T. K. 2011. Zinc Requirement During Meiosis I–Meiosis II Transition in Mouse Oocytes Is Independent of the MOS-MAPK Pathway1. *Biology of Reproduction*, 84(3), 526–536. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.086488>
- Bili, H., Tarlatzis, B. C., Daniilidis, M., Fleva, A., Bontis, J., Tourkantonis, A., & Mantalenakis, S. 1998. Cytokines in the human ovary: Presence in follicular fluid and correlation with leukotriene B4. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 15(2), 93–98. <https://doi.org/10.1007/BF02766833>
- Botero-Ruiz, W., Laufer, N., & DeCherney, A. H. 1984. The relationship between follicular fluid steroid concentration and successful fertilization of human oocytes in vitro. *Fertility and Sterility*, 41(6), 820–826. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)47892-1](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)47892-1)
- Boxmeer, J. C., Steegers-Theunissen, R. P. M., Lindemans, J., Wildhagen, M. F., Martini, E., Steegers, E. A. P., & Macklon, N. S. 2008. Homocysteine metabolism in the pre-ovulatory follicle during ovarian stimulation. *Human Reproduction*, 23(11), 2570–2576. <https://doi.org/10.1093/humrep/den292>
- Brown, B. W. 2000. A review on reproduction in South American camelids. *Animal Reproduction Science*, 58(3–4), 169–195. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00081-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00081-0)
- Bucevičius, J., Lukinavičius, G., & Gerasimaite, R. 2018. The use of hoechst dyes for DNA staining and beyond. *Chemosensors*, 6(2).

<https://doi.org/10.3390/chemosensors6020018>

- Bultman, S. J., Gebuhr, T. C., Pan, H., Svoboda, P., Schultz, R. M., & Magnuson, T. 2006. Maternal BRG1 regulates zygotic genome activation in the mouse. *Genes and Development*, 20(13), 1744–1754. <https://doi.org/10.1101/gad.1435106>
- Buschiazzo, J., Ialy-Radio, C., Auer, J., Wolf, J. P., Serres, C., Lefèvre, B., & Ziyat, A. 2013. Cholesterol Depletion Disorganizes Oocyte Membrane Rafts Altering Mouse Fertilization. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062919>
- Canipari, R., Epifano, O., Siracusa, G., & Salustri, A. 1995. Mouse oocytes inhibit plasminogen activator production by ovarian cumulus and granulosa cells. In *Developmental Biology* (Vol. 167, Issue 1, pp. 371–378). <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1031>
- Capecce, E., Pelanda, M., Dicugno, M., De Sampaio, E. G., Buongiorno, G., Corazza, N., Penaloza, M., Sequera, A. M., & Ruibal, G. 2016. La hormona antimülleriana como marcador de función ovárica. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*, 53(3), 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.raem.2016.06.003>
- Carabatsos, M. J., Elvin, J., Matzuk, M. M., & Albertini, D. F. 1998. Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Developmental Biology*, 204(2), 373–384. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9087>
- Carabatsos, M. J., Sellitto, C., Goodenough, D. A., & Albertini, D. F. 2000. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Developmental Biology*, 226(2), 167–179. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9863>
- Carreau, S., Bouraima-Lelong, H., & Delalande, C. 2011. Estrogens – new players in spermatogenesis. *Reproductive Biology*, 11(3), 174–193. [https://doi.org/10.1016/S1642-431X\(12\)60065-5](https://doi.org/10.1016/S1642-431X(12)60065-5)
- Céliz, R. H. 2017. *Determinación de la reserva ovárica en alpacas mediante la concentración de la hormona antimülleriana (AMH) en el plasma sanguíneo*. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Chang, C. L., Wang, T. H., Horng, S. G., Wu, H. M., Wang, H. S., & Soong, Y. K. 2002. The concentration of inhibin B in follicular fluid: Relation to oocyte maturation and embryo development. *Human Reproduction*, 17(7), 1724–1728. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.7.1724>
- Channing, C. P., Liu, C. Q., Jones, G. S., & Jones, H. 1982. Decline of follicular oocyte maturation inhibitor coincident with maturation and achievement of fertilizability of oocytes recovered at midcycle of gonadotropin-treated women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(13 I), 4184–4188. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.13.4184>
- Chaube, S. K., Prasad, P. V., Thakur, S. C., & Shrivastav, T. G. 2005. Estradiol protects clomiphene citrate-induced apoptosis in ovarian follicular cells and ovulated cumulus-oocyte complexes. *Fertility and Sterility*, 84(SUPPL. 2), 1163–1172. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2005.03.073>
- Chaube, S. K., Shrivastav, T. G., Prasad, S., Tiwari, M., Tripathi, A., Pandey, A. N., Premkumar, K. V., & Chaube, S. K. 2014. Clomiphene Citrate Induces ROS-

Mediated Apoptosis in Mammalian Oocytes. *Open Journal of Apoptosis*, 2014(03), 52–58. <https://doi.org/10.4236/OJAPO.2014.33006>

- Chiu, T. T. Y., Rogers, M. S., Law, E. L. K., Briton-Jones, C. M., Cheung, L. P., & Haines, C. J. 2002. Follicular fluid and serum concentrations of myo-inositol in patients undergoing IVF: Relationship with oocyte quality. *Human Reproduction*, 17(6), 1591–1596. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.6.1591>
- Cho, W. K., Stern, S., & Biggers, J. D. 1974. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *Journal of Experimental Zoology*, 187(3), 383–386. <https://doi.org/10.1002/jez.1401870307>
- Cirio, M. C., Martel, J., Mann, M., Toppings, M., Bartolomei, M., Trasler, J., & Chaillet, J. R. 2008. DNA methyltransferase 1o functions during preimplantation development to preclude a profound level of epigenetic variation. *Developmental Biology*, 324(1), 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.09.015>
- Combelles, C. M. H., & Albertini, D. F. 2001. Microtubule patterning during meiotic maturation in mouse oocytes is determined by cell cycle-specific sorting and redistribution of γ -tubulin. *Developmental Biology*, 239(2), 281–294. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0444>
- Combelles, C. M. H., Carabatsos, M. J. O., Kumar, T. R., Matzuk, M. M., & Albertini, D. F. 2004. Hormonal control of somatic cell oocyte interactions during ovarian follicle development. *Molecular Reproduction and Development*, 69(3), 347–355. <https://doi.org/10.1002/mrd.20128>
- Comizzoli, P., Pukazhenth, B. S., & Wildt, D. E. 2011. The competence of germinal vesicle oocytes is unrelated to nuclear chromatin configuration and strictly depends on cytoplasmic quantity and quality in the cat model. *Human Reproduction*, 26(8), 2165–2177. <https://doi.org/10.1093/humrep/der176>
- Condori, R. L., Huanca, W., Chileno, M., Cainzo, J., Valverde, F., Becerra, J. J., Quintela, L. A., & Herradon, P. G. 2011. Effect of follicle-stimulating hormone addition on in vitro maturation and cleavage of alpaca (Vicugna Pacos) Embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(1), 224. <https://doi.org/10.1071/rdv23n1ab252>
- Coticchio, G., Dal Canto, M., Guglielmo, M. C., Albertini, D. F., Mignini Renzini, M., Merola, M., Lain, M., Sottocornola, M., De Ponti, E., & Fadini, R. 2015. Double-strand DNA breaks and repair response in human immature oocytes and their relevance to meiotic resumption. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(10), 1509–1516. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0547-6>
- Crowther, J. 2009. The ELISA guidebook. In J. M. Walker (Ed.), *Springer Protocols: Methods in Molecular Biology* (second, Vol. 56, Issue 5). Humana Press. <https://doi.org/10.3109/10520298109067335>
- Dawson, A., Griesinger, G., & Diedrich, K. 2006. Screening oocytes by polar body biopsy. *Reproductive BioMedicine Online*, 13(1), 104–109. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62023-8](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62023-8)
- Del Campo, M. R., Del Campo, C. H., Donoso, M. X., Berland, M., & Mapletoft, R. J. 1994. In vitro fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology*, 41(6), 1219–1229. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90479-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90479-3)

- Díaz. 2010. *Nivel sérico de estradiol a la monta y su influencia sobre la tasa de concepción en alpacas* [Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria]. <https://doi.org/10.15381/rivep.v22i4.330>
- Díaz, R. E., Véliz, J., & Wohlk, N. 2015. Laboratorio de hormonas: Aspectos prácticos. *Revista Clínica Las Condes*, 26(6), 776–787. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.11.006>
- Ducibella, T., Rangarajan, S., & Anderson, E. 1988. The development of mouse oocyte cortical reaction competence is accompanied by major changes in cortical vesicles and not cortical granule depth. *Developmental Biology*, 130(2), 789–792. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(88\)90368-5](https://doi.org/10.1016/0012-1606(88)90368-5)
- Durlinger, A. L. L., Gruijters, M. J. G., Kramer, P., Karels, B., Kumar, T. R., Matzuk, M. M., Rose, U. M., De Jong, F. H., Uilenbroek, J. T. J., Grootegoed, J. A., & Themmen, A. P. N. 2001. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*, 142(11), 4891–4899. <https://doi.org/10.1210/endo.142.11.8486>
- Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., Puchner, M., Wiesinger, R., & Tews, G. 2003. Developmental competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity. *Human Reproduction*, 18(6), 1294–1298. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg232>
- Ebner, T., Shebl, O., Moser, M., Sommergruber, M., & Tews, G. 2008. Developmental fate of ovoid oocytes. *Human Reproduction*, 23(1), 62–66. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem280>
- Ebner, Thomas, Moser, M., Shebl, O., Sommergruber, M., Yaman, C., & Tews, G. 2008. Blood clots in the cumulus-oocyte complex predict poor oocyte quality and post-fertilization development. *Reproductive BioMedicine Online*, 16(6), 801–807. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60145-9](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60145-9)
- Enien, W. M., Chantler, E., Seif, M. W., & Elstein, M. 1998. Human ovarian granulosa cells and follicular fluid indices: The relationship to oocyte maturity and fertilization in vitro. *Human Reproduction*, 13(5), 1303–1306. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.5.1303>
- Ericsson, S. A., Boice, M. L., Funahashi, H., & Day, B. N. 1993. Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue. *Theriogenology*, 39(1), 214. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(93\)90069-h](https://doi.org/10.1016/0093-691x(93)90069-h)
- Esposito, G., Vitale, A. M., Leijten, F. P. J., Strik, A. M., Koonen-Reemst, A. M. C. B., Yurttas, P., Robben, T. J. A. A., Coonrod, S., & Gossen, J. A. 2007. Peptidylarginine deiminase (PAD) 6 is essential for oocyte cytoskeletal sheet formation and female fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 273(1–2), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.05.005>
- Fanchin, R., Mendez Lozano, D. H., Frydman, N., Gougeon, A., di Clemente, N., Frydman, R., & Taieb, J. 2007. Anti-Müllerian Hormone Concentrations in the Follicular Fluid of the Preovulatory Follicle Are Predictive of the Implantation Potential of the Ensuing Embryo Obtained by *in Vitro* Fertilization. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(5), 1796–1802. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1053>
- Fernandez-Baca, S., Hansel, W., & Novoa, C. 1970. Embryonic Mortality in the Alpaca.

- Biology of Reproduction*, 3(2), 243–251. <https://doi.org/10.1093/biolreprod/3.2.243>
- Fortune, J. E. 1994. Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals. *Biology of Reproduction*, 232, 225–232.
- Gamarra, G., Huaman, E., León, S., Carpio, M., Alvarado, E., Asparrin, M., & Vivanco, H. W. 2009. First in vitro embryo production in Alpacas (*Lama pacos*). *Reproduction, Fertility and Development*, 21(1), 177. <https://doi.org/10.1071/rdv21n1ab157>
- Gamarra, G., Ponsart, C., Lacaze, S., Guienne, B. Le, Humblot, P., Deloche, M.-C., Monniaux, D., & Ponter, A. A. 2014. Dietary propylene glycol and in vitro embryo production after ovum pick-up in heifers with different anti-Müllerian hormone profiles. *Reproduction, Fertility and Development*, 27(8), 1249–1261. <https://doi.org/10.1071/RD14091>
- Garner, D. L. 2009. Hoechst 33342: The dye that enabled differentiation of living X- and Y-chromosome bearing mammalian sperm. *Theriogenology*, 71(1), 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.023>
- Ge, H. S., Huang, X. F., Zhang, W., Zhao, J. Z., Lin, J. J., & Zhou, W. 2008. Exposure to human chorionic gonadotropin during in vitro maturation does not improve the maturation rate and developmental potential of immature oocytes from patients with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 89(1), 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.02.021>
- Gil, M. A., Maside, C., Cuello, C., Parrilla, I., Vazquez, J. M., Roca, J., & Martinez, E. A. 2012. Effects of Hoechst 33342 staining and ultraviolet irradiation on mitochondrial distribution and DNA copy number in porcine oocytes and preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 79(9), 651–663. <https://doi.org/10.1002/mrd.22071>
- Gilbert, R., Kutzler, M., Valentine, B. A., & Semevolos, S. 2006. Hyperandrogenism from an ovarian interstitial-cell tumor in an alpaca. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(6), 605–607. <https://doi.org/10.1177/104063870601800616>
- Gordon, I. 2003. *Laboratory production of cattle embryos* (2nd ed.). CABI publishing. https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=QO-KITSjqCUC&oi=fnd&pg=IA1&ots=v0YJblJofr&sig=4W3GoWMa_iFc3hCb1wpPacR-QZw
- Gu, T. P., Guo, F., Yang, H., Wu, H. P., Xu, G. F., Liu, W., Xie, Z. G., Shi, L., He, X., Jin, S. G., Iqbal, K., Shi, Y. G., Deng, Z., Szabó, P. E., Pfeifer, G. P., Li, J., & Xu, G. L. 2011. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, 477(7366), 606–612. <https://doi.org/10.1038/nature10443>
- Hatırnaz, Ş., Ata, B., Hatırnaz, E. S., Dahan, M. H., Tannus, S., Tan, J., & Tan, S. L. 2018. Oocyte in vitro maturation: A systematic review. *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Dernegi Dergisi*, 15(2), 112–125. <https://doi.org/10.4274/tjod.23911>
- Hennet, M. L., & Combelles, C. M. H. 2012. The antral follicle: A microenvironment for oocyte differentiation. *International Journal of Developmental Biology*, 56(10–12), 819–831. <https://doi.org/10.1387/ijdb.120133cc>
- Hertig, A. T. 1968. The primary human oocyte: Some observations on the fine structure of Balbiani's vitelline body and the origin of the annulate lamellae. *American Journal*

- of Anatomy*, 122(1), 107–137. <https://doi.org/10.1002/aja.1001220107>
- Hirao, Y., Miyano, T., & Kato, S. 1993. Acquisition of maturational competence in in vitro grown mouse oocytes. *Journal of Experimental Zoology*, 267(5), 543–547. <https://doi.org/10.1002/jez.1402670509>
- Howell, C. Y., Bestor, T. H., Ding, F., Latham, K. E., Mertineit, C., Trasler, J. M., & Chaillet, J. R. 2001. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell*, 104(6), 829–838. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00280-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00280-X)
- Hsieh, M., Thao, K., & Conti, M. 2011. Genetic dissection of epidermal growth factor receptor signaling during luteinizing hormone-induced oocyte maturation. *PLoS ONE*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021574>
- Hu, Y., Betzendahl, I., Cortvrindt, R., Smitz, J., & Eichenlaub-Ritter, U. 2001. Effects of low O₂ and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture. *Human Reproduction*, 16(4), 737–748. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.4.737>
- Huanca, Condori, R., Chileno, M., García, P., Cainzo, J., & Becerra, J. J. 2014. Evaluación de Cuatro Tiempos de Cultivo sobre la Tasa de Maduración y División Posfecundación in vitro de Ovocitos de Alpaca. *Rev Inv Vet Perú*, 25(4), 468–476. <https://doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10782>
- Huanca, W., Condori, R., Cainzos, J., Chileno, M., Quintela, L., Becerra, J., & Herradon, P. G. 2010. 341 In vitro maturation and in vitro fertilization of alpaca (vicugna pacos) oocytes: effect of time of incubation on nuclear maturation and cleavage. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(1), 327. <https://doi.org/10.1071/rdv22n1ab341>
- Humaidan, P., & Alsbjerg, B. 2014. GnRHa trigger for final oocyte maturation: is HCG trigger history? *Reproductive BioMedicine Online*, 29(3), 274–280. <https://doi.org/10.1016/J.RBMO.2014.05.008>
- Hussein, T. S., Thompson, J. G., & Gilchrist, R. B. 2006. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Developmental Biology*, 296(2), 514–521. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.06.026>
- Hutt, K. J. 2014. The role of BH3-only proteins in apoptosis within the ovary. *Reproduction (Cambridge, England)*, 149(2), R81-9. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0422>
- Imoedemhe, D., & Shaw, R. W. 1986. Follicular fluid α 1-antitrypsin—correlation with fertilizing capacity of oocytes. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 93(8), 863–868. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1986.tb07996.x>
- Inoue, Y., Miyamoto, S., Fukami, T., Shiota, K., Yotsumoto, F., & Kawarabayashi, T. 2009. Amphiregulin is much more abundantly expressed than transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor in human follicular fluid obtained from patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertility and Sterility*, 91(4), 1035–1041. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.01.014>
- Itskovitz, J., Rubattu, S., Rosenwaks, Z., Liu, H. C., & Sealey, J. E. 1991. Relationship of follicular fluid prorenin to oocyte maturation, steroid levels, and outcome of in vitro

- fertilization. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 72(1), 165–171. <https://doi.org/10.1210/jcem-72-1-165>
- Iwata, H., Hashimoto, S., Ohota, M., Kimura, K., Shibano, K., & Miyake, M. 2004. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction (Cambridge, England)*, 127(2), 159–164. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00084>
- Izadyar, F., Zhao, J., Van Tol, H. T. A., Colenbrander, B., & Bevers, M. M. 1999. Messenger RNA expression and protein localization of growth hormone in bovine ovarian tissue and in cumulus oocyte complexes (COCs) during in vitro maturation. *Molecular Reproduction and Development*, 53(4), 398–406. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199908\)53:4<398::AID-MRD5>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199908)53:4<398::AID-MRD5>3.0.CO;2-I)
- Jarry, H., Meyer, B., Kuhn, W., & Wuttke, W. 1988. Angiotensin II/III and substance P in human follicular fluid obtained during IVF : relation of the peptide content with follicular size. *Acta Endocrinologica*, 119, 277–282.
- Jeong, W. J., Cho, S. J., Lee, H. S., Deb, G. K., Lee, Y. S., Kwon, T. H., & Kong, I. K. 2009. Effect of cytoplasmic lipid content on in vitro developmental efficiency of bovine IVP embryos. *Theriogenology*, 72(4), 584–589. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.04.015>
- Jiang, Y., He, Y., Li, W., Ni, J., Li, J., Peng, L., Luo, L., Rui, R., & Ju, S. 2021. Exposure to chlorpyrifos leads to spindle disorganization and mitochondrial dysfunction of porcine oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology*, 173, 249–260. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2021.08.007>
- Josso, Jean Yves Picard, Rodolfo Rey, & Nathalie di Clemente. 2006. Testicular anti-Müllerian hormone: history, genetics, regulation and clinical applications. *Pediatric Endocrinology Reviews*, 3(4), 347–358. <https://doi.org/10.1016/J.BEEM.2006.09.004>
- Josso, N., Legeai, L., Forest, M. G., Chaussain, J. L., & Brauner, R. 1990. An enzyme linked immunoassay for anti-Müllerian hormone: A new tool for the evaluation of testicular function in infants and children. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 70(1), 23–27. <https://doi.org/10.1210/jcem-70-1-23>
- Kafi, M., Mesbah, F., Nili, H., & Khalili, A. 2005. Chronological and ultrastructural changes in camel (*Camelus dromedarius*) oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology*, 63(9), 2458–2470. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.059>
- Karadjole, M., Getz, I., Samardzija, M., & Matkovic, M. 2006. Influence of cysteamine supplementation during in vitro maturation of bovine oocytes on developmental rate and embryo quality. *Slovenian Veterinary Research*, 43(10), 48–51. http://www2.vf.uni-lj.si/ZB/SlovVetRes_43_Suppl_10.pdf#page=48
- Khaki1, A., Batavani, R., Najafi, G., Tahmasbian, H., Belbasi, A., & Mekarizadeh, A. 2014. Effect of Leptin on In Vitro Nuclear Maturation and Apoptosis of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Oocyte. *International Journal of Fertility & Sterility*, 8(1), 43. </pmc/articles/PMC3973162/>
- Kitajima, T. S., Ohsugi, M., & Ellenberg, J. 2011. Complete kinetochore tracking reveals error-prone homologous chromosome biorientation in mammalian oocytes. *Cell*, 146(4), 568–581. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.031>

- Kobayashi, T., Oda, T., Yoshimura, Y., Takehara, Y., Natori, M., & Nozawa, S. 1991. Androstenedione and progesterone concentrations in preovulatory follicular fluid correlate with successful fertilization and cleavage of human oocytes in vitro. *Fertility and Sterility*, *56*(2), 301–305. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)54489-6](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)54489-6)
- Kono, T., Sotomaru, Y., Katsuzawa, Y., & Dandolo, L. 2002. Mouse parthenogenetic embryos with monoallelic H19 expression can develop to day 17.5 of gestation. *Developmental Biology*, *243*(2), 294–300. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0561>
- Kreiner, D., Veeck, L., Liu, H. C., Rosenwaks, Z., & Itskovitz, J. 1987. Follicular fluid estradiol and progesterone are markers of preovulatory oocyte quality. *Fertility and Sterility*, *48*(6), 991–994. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)59597-1](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)59597-1)
- Lau, C. P., Ledger, W. L., Groome, N. P., Barlow, D. H., & Muttukrishna, S. 1999. Dimeric inhibins and activin A in human follicular fluid and oocyte-cumulus culture medium. *Human Reproduction*, *14*(10), 2525–2530. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.10.2525>
- Léavesque, J. T., & Sirard, M. -A. 1995. Effects of different kinases and phosphatases on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, *42*(1), 114–121. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080420115>
- Lédée, N., Lombroso, R., Lombardelli, L., Selva, J., Dubanchet, S., Chaouat, G., Frankenne, F., Foidart, J. M., Maggi, E., Romagnani, S., Ville, Y., & Piccinni, M. P. 2008. Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: The role of granulocyte colony-stimulating factor. *Human Reproduction*, *23*(9), 2001–2009. <https://doi.org/10.1093/humrep/den192>
- Lee, M., Z. B.-R., F. M., L. M., & GL, F. 1987. Relationship of human oocyte maturity, fertilization, and cleavage to follicular fluid prolactin and steroids. *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer : IVF*, *4*(3), 168–172. <https://doi.org/10.1007/BF01555465>
- Lee, Wu, M. Y., Chen, M. J., Chao, K. H., Ho, H. N., & Yang, Y. S. 2004. Nitric oxide is associated with poor embryo quality and pregnancy outcome in in vitro fertilization cycles. *Fertility and Sterility*, *82*(1), 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.02.097>
- Leisinger, C. A., Coffman, E. A., Coutinho da Silva, M. A., Forshey, B. S., & Pinto, C. R. F. 2014. Factors affecting in vitro maturation of alpaca (*Lama pacu*) oocytes. *Animal Reproduction Science*, *150*(1–2), 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.08.011>
- Lequin, R. M. 2005. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, *51*(12), 2415–2418. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051532>
- Li, L., Zheng, P., & Dean, J. 2010. Maternal control of early mouse development. *Development*, *870*, 859–870. <https://doi.org/10.1242/dev.039487>
- Li, Liu, D. J., Cang, M., Wang, L. M., Jin, M. Z., Ma, Y. Z., & Shorgan, B. 2009. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Animal Reproduction Science*, *114*(1–3), 89–98. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2008.09.018>

- Lin, Y. H., Hwang, J. L., Seow, K. M., Huang, L. W., Chen, H. J., & Tzeng, C. R. 2009. Effects of growth factors and granulosa cell co-culture on in-vitro maturation of oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*, 19(2), 165–170. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60068-5](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60068-5)
- Lisi, F., Rinaldi, L., Fishel, S., Lisi, R., Pepe, G. P., Picconeri, M. G., & Campbell, A. 2002. Use of recombinant LH in a group of unselected IVF patients. *Reproductive Biomedicine Online*, 5(2), 104–108. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61610-0](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61610-0)
- Longo, F. J. 1987. Actin-plasma membrane associations in mouse eggs and oocytes. *Journal of Experimental Zoology*, 243(2), 299–309. <https://doi.org/10.1002/jez.1402430215>
- Loontjens, F. G., Dumortier, L., Regenfuss, P., Zechel, A., & Clegg, R. M. 1990. Binding Characteristics of Hoechst 33258 with Calf Thymus DNA, Poly[d(A-T)], and d(CCGGAATTCCGG): Multiple Stoichiometries and Determination of Tight Binding with a Wide Spectrum of Site Affinities. *Biochemistry*, 29(38), 9029–9039. <https://doi.org/10.1021/bi00490a021>
- López, N., & Sánchez, J. 2013. *Análisis de los niveles de hormonas esteroideas en líquido folicular para optimización de los resultados de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides* (Universidad Autónoma de Madrid (ed.)). https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/666751/lopez_carpintero_nayara.pdf?sequence=1
- Loutradis, D., Drakakis, P., Kallianidis, K., Milingos, S., Dendrinis, S., & Michalas, S. 1999. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 72(2), 240–244. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00233-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00233-2)
- Luense, L. J., Carletti, M. Z., & Christenson, L. K. 2009. Role of Dicer in female fertility. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 20(6), 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.05.001>
- Ma, J., Zeng, F., Schultz, R. M., & Tseng, H. 2006. Basonuclin: A novel mammalian maternal-effect gene. *Development*, 133(10), 2053–2062. <https://doi.org/10.1242/dev.02371>
- Machtiger, R., Combelles, C. M. H., Missmer, S. A., Correia, K. F., Williams, P., Hauser, R., & Racowsky, C. 2013. Bisphenol-A and human oocyte maturation in vitro. *Human Reproduction*, 28(10), 2735–2745. <https://doi.org/10.1093/humrep/det312>
- Malamitsi-puchner, A., Sarandakou, A., & Baka, S. 2004. Soluble Fas Concentrations in the Follicular Fluid and Oocyte-Cumulus Complex Culture. *J Soc Gynecol Investing*, 11(8), 566–569.
- Manau, D., Balasch, J., Jiménez, W., Fábregues, F., Civico, S., Casamitjana, R., Creus, M., & Vanrell, J. A. 2000. Follicular fluid concentrations of adrenomedullin, vascular endothelial growth factor and nitric oxide in IVF cycles: Relationship to ovarian response. *Human Reproduction*, 15(6), 1295–1299. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.6.1295>
- Martorell, H. P. 2000. *Biología del trasplante y micromanipulación de embriones de bovinos y camélidos de los Andes*. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=inperupe.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expre>

sion=mfn=008784

- Massagué, J., & Chen, Y.-G. 2000. Controlling TGF- β signaling. *Genes and Development*, 627–644.
- Matsuda, F., Inoue, N., Manabe, N., & Ohkura, S. 2012. Follicular Growth and Atresia in Mammalian Ovaries: Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells. *Journal of Reproduction and Development*, 58(1), 44–50. <https://doi.org/10.1262/JRD.2011-012>
- McGinnis, L. K., Carroll, D. J., & Kinsey, W. H. 2011. Protein tyrosine kinase signaling during oocyte maturation and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 78(10–11), 831–845. <https://doi.org/10.1002/mrd.21326>
- McGinnis, L. K., Kinsey, W. H., & Albertini, D. F. 2009. Functions of Fyn kinase in the completion of meiosis in mouse oocytes. *Developmental Biology*, 327(2), 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.11.038>
- Melado, L. 2014. *Universidad autónoma de madrid*. Universidad Autónoma de Madrid.
- Mendoza, C., Cremades, N., Ruiz-Requena, E., Martinez, F., Ortega, E., Tesarik, S., & Jan, B. 1999. Relationship between fertilization results after intracytoplasmic sperm injection, and intrafollicular steroid, pituitary hormone and cytokine concentrations. *Human Reproduction*, 14(3), 628–635. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.3.628>
- Mendoza, C., Ruiz-Requena, E., Ortega, E., Cremades, N., Martinez, F., Bernabeu, R., Greco, E., & Tesarik, J. 2002. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Human Reproduction*, 17(4), 1017–1022. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.4.1017>
- Mermillod, P., Oussaid, B., & Cognié, Y. 1999. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 54(May), 449–460. <https://doi.org/10.1530/biosciprocs.4.035>
- Meyts, E. W. A. R., Jørgensen, N., Græm, N., Mu, J., Cate, R. L., Skakkebaek, N. E., Growth, D., Reproduction, E. R. M., & Pathology, N. G. 1999. *Expression of Anti-Müllerian Hormone during Normal and Pathological Gonadal Development : Association with Differentiation of Sertoli and Granulosa Cells*. 84(10), 3836–3844.
- Miragaya, M. H., Chaves, M. G., & Agüero, A. 2006. Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Ruminant Research*, 61(2-3 SPEC. ISS.), 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.017>
- Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Veshkini, A., Hajarizadeh, A., Jamshidi-Adegani, F., Zhandi, M., Abazari-Kia, A. H., Cinar, M. U., Soleimani, M., & Gastal, E. L. 2014. Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity with oocyte cytoplasmic lipid content, developmental competence, and expression of candidate genes in a sheep model. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(8), 1089–1098. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0264-6>
- Moniruzzaman, M., & Miyano, T. 2010. Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals. *Journal of Reproduction and Development*, 56(6), 559–566. <https://doi.org/10.1262/jrd.10-071H>
- Monti, M., Calligaro, A., Behr, B., Pera, R. R., Redi, C. A., & Wossidlo, M. 2017.

- Functional topography of the fully grown human oocyte. *European Journal of Histochemistry*, 61(1), 32–35. <https://doi.org/10.4081/ejh.2017.2769>
- Monti, M., Garagna, S., Redi, C., & Zuccotti, M. 2006. Gonadotropins Affect Oct-4 Gene Expression During Mouse Oocyte Growth. *MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT*, 73, 685–691. <https://doi.org/10.1002/mrd>
- Monti, M., & Redi, C. 2009. Oogenesis specific genes (Nobox, Oct4, Bmp15, Gdf9, Oogenesis1 and Oogenesis2) are differentially expressed during natural and gonadotropin-induced mouse follicular development. *Molecular Reproduction and Development*, 76(10), 994–1003. <https://doi.org/10.1002/mrd.21059>
- Mortensen, R. D., Serra, M., Steitz, J. A., & Vasudevan, S. 2011. Posttranscriptional activation of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes by microRNA-protein complexes (microRNPs). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(20), 8281–8286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105401108>
- Moulavi, F., & Hosseini, S. M. 2019. Effect of macromolecule supplement on nuclear and cytoplasmic maturation, cryosurvival and in vitro embryo development of dromedary camel oocytes. *Theriogenology*, 132, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.027>
- Munné, S., Weier, H. U. G., Grifo, J., & Cohen, J. 1994. Chromosome Mosaicism in Human Embryos. *Biology of Reproduction*, 51(3), 373–379. <https://doi.org/10.1095/biolreprod51.3.373>
- Navarro, P. A., de Araújo, M. M., de Araújo, C. M., Rocha, M., dos Reis, R., & Martins, W. 2009. Relationship between first polar body morphology before intracytoplasmic sperm injection and fertilization rate, cleavage rate, and embryo quality. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 104(3), 226–229. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2008.11.008>
- Naz, R. K., Zhu, X., & Menge, A. C. 1997. Expression of tumor necrosis factor- α and its receptors type I and type II in human oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 47(2), 127–133. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199706\)47:2<127::AID-MRD1>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199706)47:2<127::AID-MRD1>3.0.CO;2-O)
- Nicosia, S. V., Wolf, D. P., & Inoue, M. 1977. Cortical granule distribution and cell surface characteristics in mouse eggs. *Developmental Biology*, 57(1), 56–74. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(77\)90354-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(77)90354-2)
- Niu, G., & Chen, X. 2010. Apoptosis Imaging: Beyond Annexin V. *Journal of Nuclear Medicine*, 51(11), 1659–1662. <https://doi.org/10.2967/JNUMED.110.078584>
- Nogueira, D., Ron-El, R., Friedler, S., Schachter, M., Raziel, A., Cortvrindt, R., & Smitz, J. 2006. Meiotic Arrest In Vitro by Phosphodiesterase 3-Inhibitor Enhances Maturation Capacity of Human Oocytes and Allows Subsequent Embryonic Development1. *Biology of Reproduction*, 74(1), 177–184. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.040485>
- Norambuena, M. C., Hernández, F., Maureira, J., Rubilar, C., Alfaro, J., Silva, G., Silva, M., & Ulloa-Leal, C. 2017. Effects of leptin administration on development, vascularization and function of Corpus luteum in alpacas submitted to pre-ovulatory fasting. *Animal Reproduction Science*, 182(February), 28–34.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.04.006>

- Nowshari, M. A. 2005. The effect of harvesting technique on efficiency of oocyte collection and different maturation media on the nuclear maturation of oocytes in camels (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology*, 63(9), 2471–2481. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.057>
- Ohta, N., Saito, H., Kaneko, T., Yoshida, M., Takahashi, T., Saito, T., Nakahara, K., & Hiroi, M. 2001. Soluble CD44 in human ovarian follicular fluid. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 18(1), 21–25. <https://doi.org/10.1023/A:1026494528415>
- Otsuka, F., McTavish, K. J., & Shimasaki, S. 2011. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Molecular Reproduction and Development*, 78(1), 9–21. <https://doi.org/10.1002/mrd.21265>
- Otsuki, J., Nagai, Y., & Chiba, K. 2007. Lipofuscin bodies in human oocytes as an indicator of oocyte quality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24(7), 263–270. <https://doi.org/10.1007/s10815-007-9130-0>
- Pacheco, J. I., Coila, P. U., Olivera, M., & Quispe, A. 2019. Variations of the biochemical composition of the alpaca follicular according to the growth status of the ovarian follicle. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 30(4), 1629–1636. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i4.17193>
- Pacompiá, M. 2017. *Efecto de las gonadotropinas en la maduración y fertilización de ovocitos en alpacas (Vicugna pacos)*.
- Paczkowski, M., Yuan, Y., Fleming-Waddell, J., Bidwell, C. A., Spurlock, D., & Krisher, R. L. 2011. Alterations in the transcriptome of porcine oocytes derived from prepubertal and cyclic females is associated with developmental potential. *Journal of Animal Science*, 89(11), 3561–3571. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4193>
- Pangas, S. A., & Rajkovic, A. 2006. Transcriptional regulation of early oogenesis: In search of masters. *Human Reproduction Update*, 12(1), 65–76. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi033>
- Parfenov, V., Potchukalina, G., Dudina, L., Kostyuchek, D., & Gruzova, M. 1989. Human antral follicles: Oocyte nucleus and the karyosphere formation (electron microscopic and autoradiographic data). *Gamete Research*, 22(2), 219–231. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120220209>
- Parrott, J. A., & Skinner, M. K. 1999. Kit-Ligand/Stem Cell Factor Induces Primordial Follicle Development and Initiates Folliculogenesis. *Endocrinology*, 140(9), 4262–4271. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00391-4](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00391-4)
- Pasqualotto, E. B., Agarwal, A., Sharma, R. K., Izzo, V. M., Pinotti, J. A., Joshi, N. J., & Rose, B. I. 2004. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertility and Sterility*, 81(4), 973–976. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.11.021>
- Paszkowski, T., Traub, A. I., Robinson, S. Y., & McMaster, D. 1995. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clinica Chimica Acta*, 236(2), 173–180. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(95\)98130-9](https://doi.org/10.1016/0009-8981(95)98130-9)
- Pérez, M. G. 2019. Producción de embriones in vitro en una incubadora portátil de dióxido de carbono y viabilidad in vivo post transferencia a vacas receptoras. *Revista*

de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research, 21(4), 249–256.
<https://doi.org/10.18271/ria.2019.501>

- Phocas, I., Sarandakou, A., Rizos, D., Dimitriadou, F., Mantzavinos, T., & Zourlas, P. A. 1994. Tumour-associated antigens, CEA, CA 125 and SCC in serum and follicular fluid of stimulated and unstimulated cycles. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 54(2), 131–136. [https://doi.org/10.1016/0028-2243\(94\)90252-6](https://doi.org/10.1016/0028-2243(94)90252-6)
- Placido, G. De, Alviggi, C., Clarizia, R., Mollo, A., Alviggi, E., Strina, I., Fiore, E., Wilding, M., Pagano, T., & Matarese, G. 2006. Intra-follicular leptin concentration as a predictive factor for in vitro oocyte fertilization in assisted reproductive techniques. *J. Endocrinol. Invest.*, 29, 719–726.
- Plant, T. M., & Zeleznik, A. J. 2015. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (Vol. 1). Elsevier.
- Plonowski, A., Kaplinski, A. K., Radzikowska, M., Borowiec, M., & Baranowska, B. 1999. Correlation between 21 amino acid endothelin, intrafollicular steroids and follicle size in stimulated cycles. *Human Reproduction*, 14(9), 2323–2327. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.9.2323>
- Posfai, E., Kunzmann, R., Brochard, V., Salvaing, J., Cabuy, E., Roloff, T. C., Liu, Z., Tardat, M., van Lohuizen, M., Vidal, M., Beaujean, N., & Peters, A. H. F. M. 2012. Polycomb function during oogenesis is required for mouse embryonic development. *Genes and Development*, 26(9), 920–932. <https://doi.org/10.1101/gad.188094.112>
- Purcell, S. H., Chi, M. M., & Moley, K. H. 2012. Insulin-Stimulated Glucose Uptake Occurs in Specialized Cells within the Cumulus Oocyte Complex. *Endocrinology*, 153(5), 2444–2454. <https://doi.org/10.1210/EN.2011-1974>
- Raggi, L. A., Ferrando, G., Parraguez, V. H., MacNiven, V., & Urquieta, B. 1999. Plasma progesterone in alpaca (*Lama pacos*) during pregnancy, parturition and early postpartum. *Animal Reproduction Science*, 54(4), 245–249. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(98\)00156-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(98)00156-0)
- Rama Raju, G. A., Prakash, G. J., Krishna, K. M., & Madan, K. 2007. Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: A preliminary study using PolScope imaging. *Reproductive BioMedicine Online*, 14(2), 166–174. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60784-5](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60784-5)
- Revelli, A., Dolfin, E., Gennarelli, G., Lantieri, T., Massobrio, M., Holte, J. G., & Turkaspa, I. 2008. Low-dose acetylsalicylic acid plus prednisolone as an adjuvant treatment in IVF: a prospective, randomized study. *Fertility and Sterility*, 90(5), 1685–1691. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.08.037>
- Revelli, A., Piane, L. D., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., & Rinaudo, P. 2009. Follicular fluid content and oocyte quality: From single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-40>
- Richani, D., & Gilchrist, R. B. 2018. The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Human Reproduction Update*, 24(1), 1–14. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMX029>

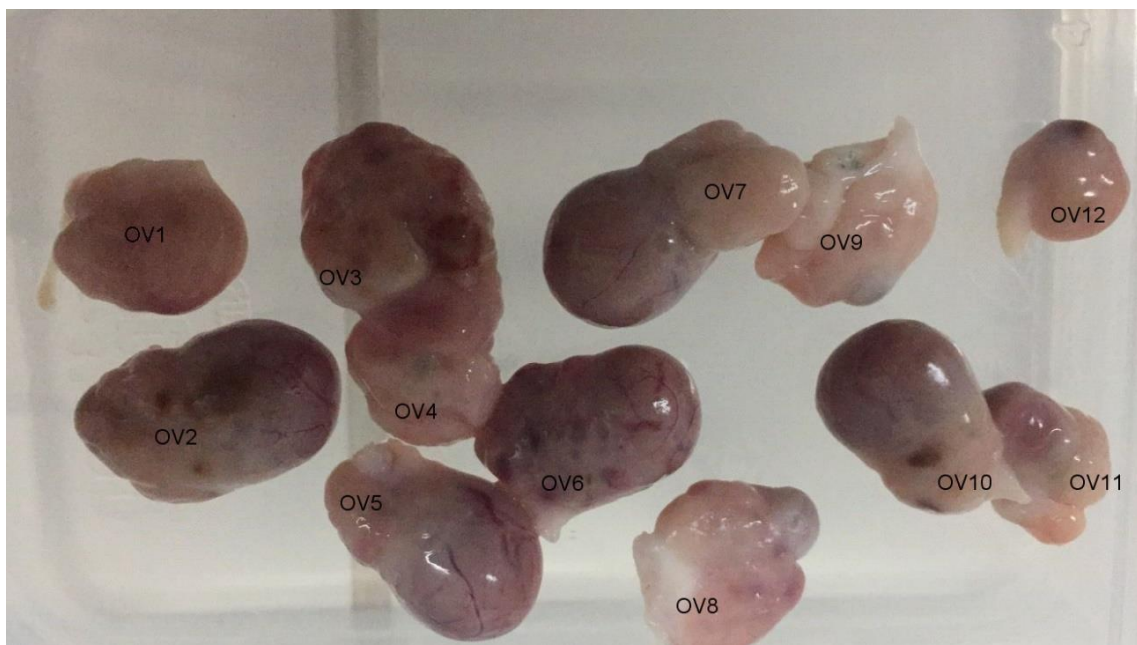
- Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., & Barreda, D. R. 2011. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 50, e2597. <https://doi.org/10.3791/2597>
- Rienzi, L., Ubaldi, F. M., Iacobelli, M., Minasi, M. G., Romano, S., Ferrero, S., Sapienza, F., Baroni, E., Litwicka, K., & Greco, E. 2008. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertility and Sterility*, 90(5), 1692–1700. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.09.024>
- Rosenbusch, B., Djalali, M., & Sterzik, K. 1992. Is there any correlation between follicular fluid hormone concentrations, fertilizability, and cytogenetic analysis of human oocytes recovered for in vitro fertilization? *Fertility and Sterility*, 57(6), 1358–1360. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)55105-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)55105-X)
- Ruiz, J., Paulo Santayana, R., José Mendoza, M., Leandra Landeo, J., Huamán, E., Ticllacuri, F., Fidel Mujica, L., Silva, M., & Ratto, M. H. 2017. Effect of oocyte maturation time, sperm selection method and oxygen tension on in vitro embryo development in alpacas. *Theriogenology*, 95, 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.006>
- Saadeldin, I. M., Swelum, A. A. A., & Alowaimer, A. N. 2019. In Vitro Culture of Camelid Embryos. *Methods in Molecular Biology*, 2006, 209–218. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9566-0_15
- Saadeldin, I. M., Swelum, A. A. A., Yaqoob, S. H., & Alowaimer, A. N. 2017. Morphometric assessment of in vitro matured dromedary camel oocytes determines the developmental competence after parthenogenetic activation. *Theriogenology*, 95, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.015>
- Saito, H., Kaneko, T., Takahashi, T., Kawachiya, S., Saito, T., & Hiroi, M. 2000. Hyaluronan in follicular fluids and fertilization of oocytes. *Fertility and Sterility*, 74(6), 1148–1152. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)01586-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)01586-7)
- Sanabria, J., & Lhomme, J. P. 2013. Climate change and potato cropping in the Peruvian Altiplano. *Theoretical and Applied Climatology*, 112(3–4), 683–695. <https://doi.org/10.1007/s00704-012-0764-1>
- Sathananthan, A. H., Selvaraj, K., Lakshmi Girijashankar, M., Ganesh, V., Selvaraj, P., & Trounson, A. O. 2006. From oogonia to mature oocytes: Inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microscopy Research and Technique*, 69(6), 396–407. <https://doi.org/10.1002/jemt.20299>
- Semevolos, S. A., Reed, S. K., & Schultz, L. G. 2013. Evaluation of serum trace mineral, vitamin D, and sex steroid hormone concentration, and survey data in llamas and alpacas with metacarpophalangeal and metatarsophalangeal hyperextension. *American Journal of Veterinary Research*, 74(1), 48–52. <https://doi.org/10.2460/ajvr.74.1.48>
- Shahedi, A., Khalili, M. A., Soleimani, M., & Morshedizad, S. 2013. Ultrastructure of in vitro matured human oocytes. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 15(12). <https://doi.org/10.5812/ircmj.7379>
- Shu, Y. M., Zeng, H. T., Ren, Z., Zhuang, G. L., Liang, X. Y., Shen, H. W., Yao, S. Z., Ke, P. Q., & Wang, N. N. 2008. Effects of cilostamide and forskolin on the meiotic

- resumption and embryonic development of immature human oocytes. *Human Reproduction*, 23(3), 504–513. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem344>
- Simões, L. M. S., Santos, A. P. C., Bottino, M. P., Lima, E. A., Fernandes, U. R., Orlandi, R. E., Rodrigues, S. A. D., Caixeta, F. M., Alves, N. G., Souza, J. C., Quintão, C. C. R., Camargo, L. S. A., Dode, M. A. N., & Sales, J. N. S. 2021. Nuclear maturation kinetics and in vitro fertilization of immature bovine oocytes injected into pre-ovulatory follicles. *Theriogenology*, 166, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.12.021>
- Sinclair, K., Lunn, L., Kwong, W., Wonnacott, K., Linforth, R., & Craigon, J. 2008. Amino acid and fatty acid composition of follicular fluid as predictors of in-vitro embryo development. *Reproductive BioMedicine Online*, 16(6), 859–868. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60153-8](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60153-8)
- Skidmore, J. A., Crichton, E. G., Malo, C. M., Vaughan, J. L., Wani, N. A., & Herrid, M. 2020. Reproductive technologies in camelids. In *Reproductive Technologies in Animals*. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817107-3.00008-4>
- Stanczyk, F. Z., & Clarke, N. J. 2010. Advantages and challenges of mass spectrometry assays for steroid hormones. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 121(3–5), 491–495. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.05.001>
- Su, Y. Q., Denegre, J. M., Wigglesworth, K., Pendola, F. L., O'Brien, M. J., & Eppig, J. J. 2003. Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex. *Developmental Biology*, 263(1), 126–138. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00437-8](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00437-8)
- Suchanek, E., Simunic, V., Juretic, D., & Grizelj, V. 1994. Follicular fluid contents of hyaluronic acid, follicle-stimulating hormone and steroids relative to the success of in vitro fertilization of human oocytes. *Fertility and Sterility*, 62(2), 347–352. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)56890-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)56890-3)
- Suzuki, T., Sumantri, C., Khan, N. H. A., Murakami, M., & Saha, S. 1999. Development of a simple, portable carbon dioxide incubator for in vitro production of bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 54(3), 149–157. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(98\)00134-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(98)00134-1)
- Szöllosi, D., & Ozil, J. P. 1991. De novo formation of centrioles in parthenogenetically activated, diploidized rabbit embryos. *Biology of the Cell*, 72(1–2), 61–66. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(91\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0248-4900(91)90079-3)
- Takahashi, C., Fujito, A., Kazuka, M., Sugiyama, R., Ito, H., & Isaka, K. 2008. Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 89(3), 586–591. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.03.080>
- Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., Taketani, T., Matsuoka, A., Yamagata, Y., Shimamura, K., Morioka, H., Ishikawa, H., Reiter, R. J., & Sugino, N. 2008. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research*, 44(3), 280–287. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00524.x>
- Tay, J., Hodgman, R., & Richter, J. D. 2000. The control of cyclin B1 mRNA translation

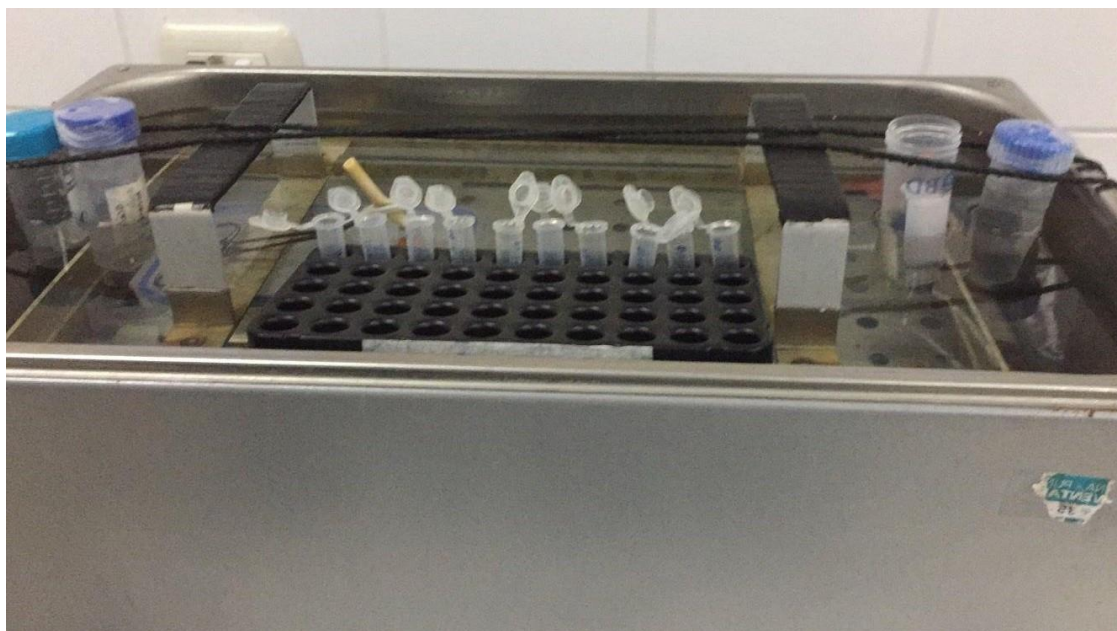
- during mouse oocyte maturation. *Developmental Biology*, 221(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9669>
- Tesarik, J., & Mendoza, C. 1997. *Direct non-genomic effects of follicular steroids on maturing human oocytes : oestrogen versus androgen antagonism*. 3(2), 95–100.
- Trasorras, V., Giuliano, S., & Miragaya, M. 2013. In vitro production of embryos in South American camelids. *Animal Reproduction Science*, 136(3), 187–193.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.009>
- Tríbulo, P., Rivera, R. M., Ortega Obando, M. S., Jannaman, E. A., & Hansen, P. J. 2019. Production and Culture of the Bovine Embryo. *Methods in Molecular Biology*, 2006, 115–129. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9566-0_8
- Tripathi, A., Shrivastav, T. G., & Chaube, S. K. 2013. An increase of granulosa cell apoptosis mediates aqueous neem (*Azadirachta indica*) leaf extract-induced oocyte apoptosis in rat. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 3(1), 27. <https://doi.org/10.4103/2229-516X.112238>
- Ulises, Q. G., Teodosio Huanca Mamani, & Luis V. Olivera Marocho. 2019. Influencia de las hormonas folículo estimulante, luteinizante y gonadotropina coriónica equina en la maduración in vitro de ovocitos y clivaje de embriones de alpaca. *REVISTA DE INVESTIGACIONES DE LA ESCUELA DE POSGRADO*, 974–985.
<http://revistas.unap.edu.pe/epg/index.php/investigaciones/article/view/774/246>
- Van Blerkom, J., Antczak, M., & Schrader, R. 1997. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: Association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Human Reproduction*, 12(5), 1047–1055.
<https://doi.org/10.1093/humrep/12.5.1047>
- Vanluchene, E., Hinting, A., Dhont, M., de Sutter, P., van Maele, G., & Vandekerckhove, D. 1991. Follicular fluid steroid levels in relation to oocyte maturity and in vitro fertilization. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 38(1), 83–87. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(91\)90405-T](https://doi.org/10.1016/0960-0760(91)90405-T)
- Vaughan, MacMillan, K. L., Anderson, G. A., & D’Occhio, M. J. 2003. Effects of mating behaviour and the ovarian follicular state of female alpacas on conception. *Australian Veterinary Journal*, 81(1–2), 86–90. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2003.tb11442.x>
- Verlhac, M.-H., & Breuer, M. 2013. Cytoskeletal Correlates of Oocyte Meiotic Divisions. *Oogenesis*, 1–353. <https://doi.org/10.1007/978-0-85729-826-3>
- Volkery, J., Gottschalk, J., Sobiraj, A., Wittek, T., & Einspanier, A. 2012. Progesterone, pregnanediol-3-glucuronide, relaxin and oestrone sulphate concentrations in saliva, milk and urine of female alpacas (*Vicugna pacos*) and their application in pregnancy diagnosis. *Veterinary Record*, 171(8), 195. <https://doi.org/10.1136/vr.100393>
- Wang, Q., & Sun, Q. Y. 2007. Evaluation of oocyte quality: Morphological, cellular and molecular predictors. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1071/RD06103>
- Wassarman, P. M., & Letourneau, G. E. 1976. RNA synthesis in fully-grown oocytes. *Nature*, 73–74.

- Webster, B. W., Diamond, M. P., Osteen, K. G., & Wentz, A. C. 1988. Endocrine profile of follicles containing oocytes with subsequent polyploid fertilization. *Fertility and Sterility*, 50(5), 727–731. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)60306-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)60306-0)
- Wen, X., D, L., AJ, T., SM, D., & RK, I. 2010. Estradiol, progesterone, testosterone profiles in human follicular fluid and cultured granulosa cells from luteinized pre-ovulatory follicles. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 8. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-117>
- Wickramasinghe, D., Ebert, K. M., & Albertini, D. F. 1991. Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes. *Developmental Biology*, 143(1), 162–172. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(91\)90063-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(91)90063-9)
- Wilding, M., Di Matteo, L., D'Andretti, S., Montanaro, N., Capobianco, C., & Dale, B. 2007. An oocyte score for use in assisted reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24(8), 350–358. <https://doi.org/10.1007/s10815-007-9143-8>
- Wilson, C. A., di Clemente, N., Ehrenfels, C., Pepinsky, R. B., Josso, N., Vigier, B., & Cate, R. L. 1993. Mullerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor- β superfamily. *Molecular Endocrinology*, 7(2), 247–257. <https://doi.org/10.1210/mend.7.2.8469238>
- Wood, T. 1986. Physiological functions of the pentose phosphate pathway. *Cell Biochemistry and Function*, 4(4), 241–247. <https://doi.org/10.1002/cbf.290040403>
- Wu, Y. T., Tang, L., Cai, J., Lu, X. E., Xu, J., Zhu, X. M., Luo, Q., & Huang, H. F. 2007. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. *Human Reproduction*, 22(6), 1526–1531. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem029>
- Yanaihara, A., Mitsukawa, K., Iwasaki, S., Otsuki, K., Kawamura, T., & Okai, T. 2007. High concentrations of lactoferrin in the follicular fluid correlate with embryo quality during in vitro fertilization cycles. *Fertility and Sterility*, 87(2), 279–282. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.06.025>
- Yang, Y. jie, Zhang, Y. jun, & Li, Y. 2009. Ultrastructure of human oocytes of different maturity stages and the alteration during in vitro maturation. *Fertility and Sterility*, 92(1), 396.e1-396.e6. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.02.010>
- Yuan, Y. Q., Van Soom, A., Leroy, J. L. M. R., Dewulf, J., Van Zeveren, A., De Kruif, A., & Peelman, L. J. 2005. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology*, 63(8), 2147–2163. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2004.09.054>
- Zirena, A. N. 2019. *Hormona antimülleriana y su relación con folículos, ovocitos y onda folicular en alpacas suri*. Universidad Nacional Agraria La Molina.

VIII. ANEXOS



Anexo 1. Fotografía de ovarios de alpacas



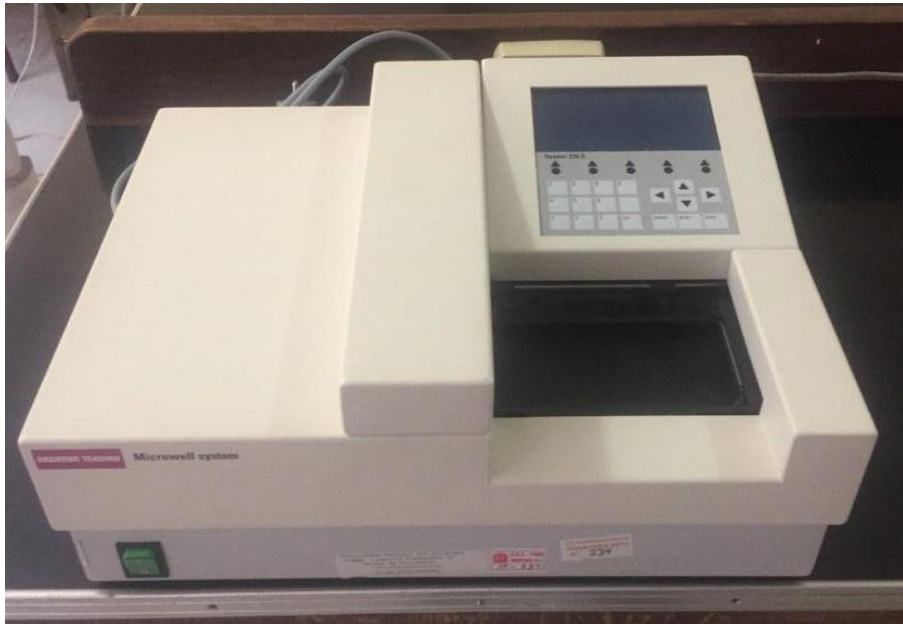
Anexo 2. Fotografía de la cámara de atemperamiento de ovocitos, los medios de cultivo, medio de lavados y aceite para laboratorio a 38.5 °C



Anexo 3. Aplicación de la tinción acetato-orceína sobre los ovocitos



Anexo 4. Fotografía de los medios de cultivo para la maduración in vitro



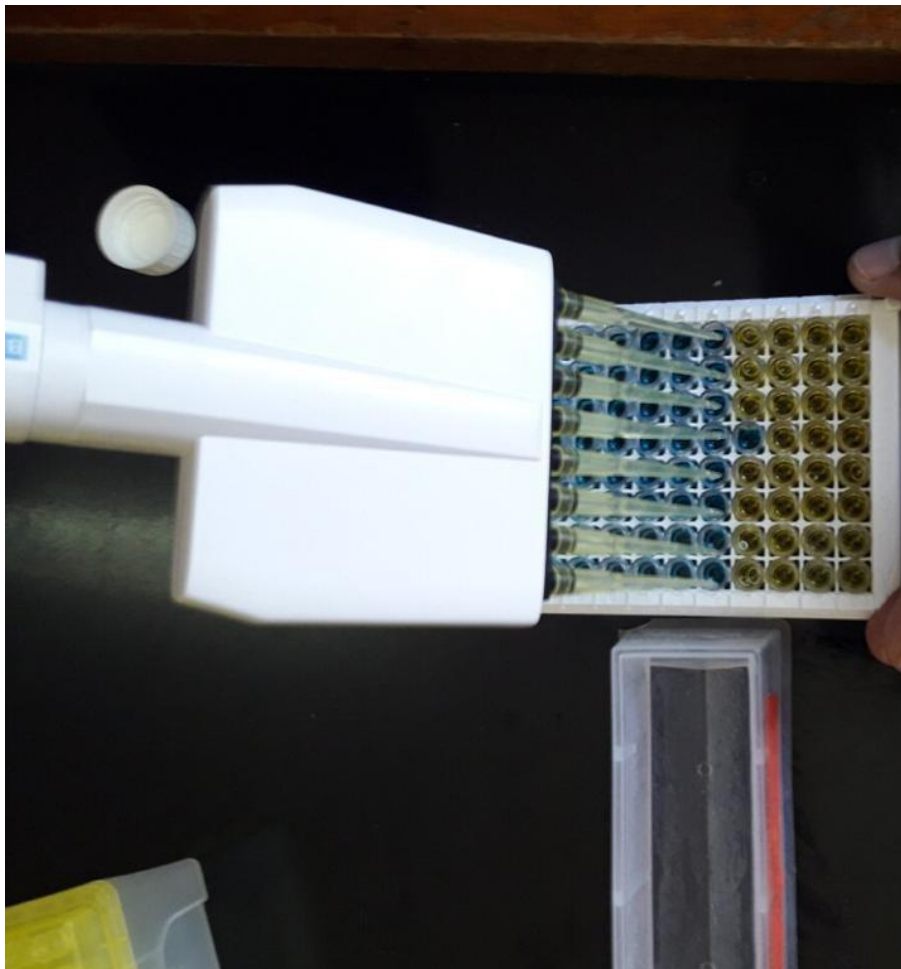
Anexo 5. Espectrofotómetro para la dedición de hormonas



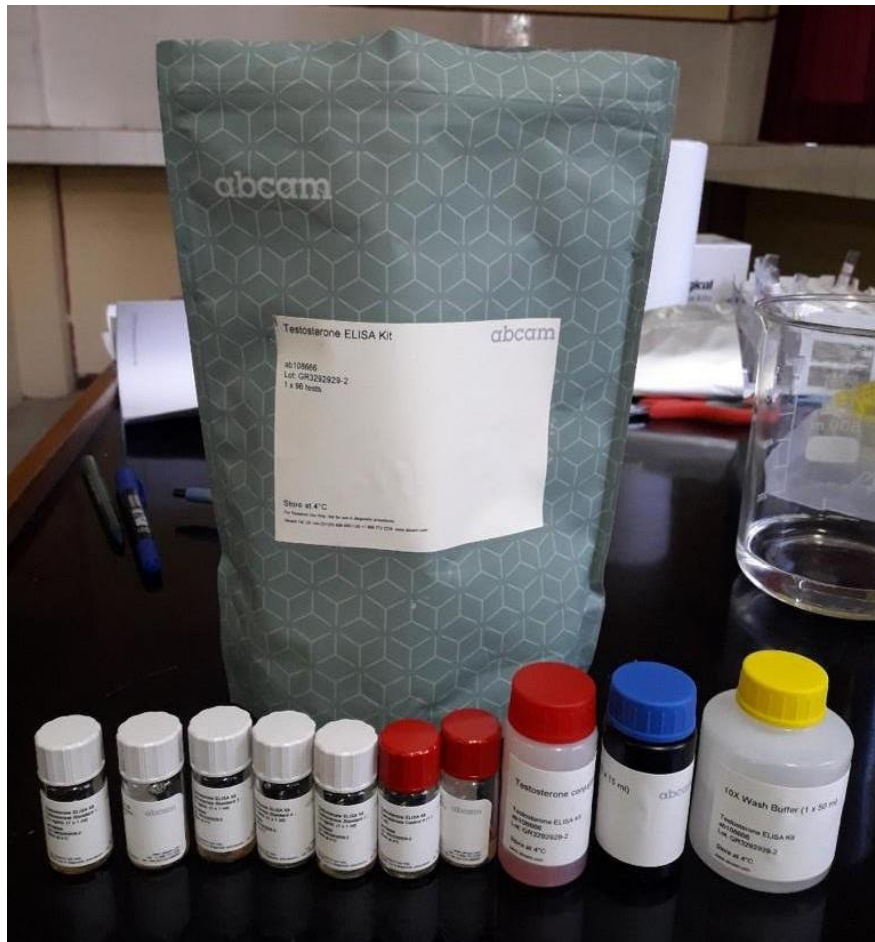
Anexo 6. Microscopio de fluorescencia para la medición de apoptosis



Anexo 7. Kits para determinar la apoptosis



Anexo 8. Reacción de los anticuerpos monoclonales y las hormonas reproductivas



Anexo 9. Kit de ELISA de Testosterona para determinar la concentración de hormonas



Anexo 10. Kit de ELISA de Progesterona para determinar la concentración de hormonas

Anexo 11. Artículo publicado en Journal of Animal Science and Research

Comparison of Two *In vitro* Maturation Media in Their Efficiency for Production of Competent Alpaca Oocytes

Delo Dalison Huamani Mallma^{1*}, Fidel Washington Gutiérrez Yana², Manuel Guido Pérez Durand², B Damiano Vásquez², and HW Vivanco-Mackie^{1,4}

¹Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú

²Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú

³Universidad Nacional José María Arguedas, Apurímac, Perú

⁴Vivanco International SAC, Lima, Lima, Perú

*Corresponding author: Delo Dalison Huamani Mallma, Av. Cesar Vallejo N 2, 10, H, 8. Lima 42, V.E.S. 15834, Perú, E-mail: dalison_2108_31@hotmail.com

Received: 15 Oct, 2021 | Accepted: 24 Nov, 2021 | Published: 04 Dec, 2021

Citation: Mallma DDH, Yana FWG, Durand MGP, Vásquez BD, Mackie HWV (2021) Comparison of Two *In vitro* Maturation Media in Their Efficiency for Production of Competent Alpaca Oocytes. *J Anim Sci Res* 5(2): dx.doi.org/10.16966/2576-6457.155

Copyright: © 2021 Mallma DDH, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Oocyte maturation is the most critical process in *in vitro* culture, since the oocyte acquires competence for future processes, which involve the resumption of meiosis, epigenetic regulation, polyspermy block, activation of the zygote, exchange of protamines to histones, cleavage, cell polarization, embryonic stem cell proliferation, and implantation. Therefore, the objective of this study was to evaluate the efficiency of two different *in vitro* maturation media in the production of competent alpaca oocytes matured *in vitro*. The competency evaluated by morphometry and cytoplasmic and nuclear staining techniques. Alpaca ovaries (n=44) were sourced from slaughterhouse, transported to laboratory in thermoses with saline solution at 33-36°C and subjected to follicular aspiration and/or dissection. A total of 212 oocytes were obtained. The oocytes were selected, randomized and distributed in one of the two experimental groups: Maturation medium 1 (MM1) and Maturation medium 2 (MM2) with three replicates per experiment. *In vitro* maturation was carried out in a portable incubator for 40h under 5% CO₂ conditions (produced by effervescent granules) and 38.5°C (by thermostatic bath). Nuclear maturation was assessed using acetate-orcein staining, cytoplasmic maturation using Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining and morphometry using ImageJ Software. Nuclear maturation was classified according to the meiotic stage. Cytoplasmic maturation was classified by the presence (BCB+) or absence (BCB-) of BCB staining. Morphometry evaluated the measurements of the diameter and thickness of the zona pellucida and perivitelline space of the oocyte. Nuclear maturation rate was evaluated in Metaphase, observing no significant differences (P=0.088) between MM1 (46.08 ± 5.90 %) and MM2 (54.65 ± 3.00%) in this parameter. The cytoplasmic maturation rate of MM1 (67.78 ± 4.50%) was significantly lower compared to MM2 (77.61 ± 3.58) % (P=0.014). For the diameter of the oocyte, MM1 (133.42 ± 14.56 μm) and MM2 (136.14 ± 15.2 μm) were no different (P=0.397), same for the thickness of the zona pellucida, MM1 (16.84 ± 3.96 μm) and MM2 (16.73 ± 4.98 μm) were no different (P=0.919). For the perivitelline space area, MM1 (11018.91 ± 2465.40 μm²) and MM2 (8686.18 ± 3016.88 μm²) were significantly different (P=0.0005). In conclusion, the present study shows that the MM2 medium results are better in cytoplasmic maturation and the area of the perivitelline space. The other parameters (nuclear maturation, diameter of the oocyte and thickness of the zona pellucida) were no different between the two maturation media evaluated.

Keywords: Alpaca; *In vitro* oocyte maturation; Morphometry; Nuclear maturation; Cytoplasmic maturation

Introduction

One of the goals of using advanced reproductive technologies is to increase the reproduction rate of breeding animals of high genetic value. In alpacas, the use of reproductive biotechnology techniques has been minimal. These are probably due to the complex reproductive characteristics of alpacas at the anatomical and physiological level more recently demonstrated by molecular biology [1] and on the other hand, to the lack of research support [2]. However, in recent decades more attention has been giving to basic and applied studies of these technologies due to the higher recognition of the market for the excellent quality of alpaca fiber, which generates higher economic

returns for producers and in turn, it has been the main driver for Research and Development (R&D) programs [3].

Alpacas and South American camelids, in general, have a low reproductive efficiency, about 50% of the females do not produce offspring within a year, 50% of embryos die in the first month of gestation [4] and 20% of females fail to become pregnant after mating [1]. Therefore, a more complete understanding of folliculogenesis, oogenesis, estrous, ovulation induction, formation and regression of the Corpus Luteum (CL) that can lead to improvement of the quality and viability of oocytes is needed [1]. Currently in alpacas, obtaining embryos *in vivo* by super ovulation and uterine flushing has an average

yield of 4.75 embryos per female [5]. The first successful *in vitro* embryo production in alpacas was reported the yield of 8% transferable embryos (at morula and blastocyst stage) from slaughterhouse oocytes *in vitro* matured and fertilized with frozen sperm obtained from the epididymis [6]. A recent study shows $29.7 \pm 3.8\%$ blastocysts rate [7] which is a significant progress but still the *in vitro* embryo production technology in alpacas requires further improvements compared to other domestic species. One of the factors limiting the development of the *in vitro* embryo production technology in alpacas is the low availability of oocytes due to the small number of sacrificed females and the unique reproductive characteristics that do not allow the embryo culture systems to be directly extrapolated from other species [8] being necessary to develop specific protocols for maturation, fertilization and embryonic development *in vitro* for alpacas.

Oocyte maturation is the most critical process in *in vitro* culture, since the oocyte acquires competence for future processes, which involve the resumption of meiosis, epigenetic regulation, polyspermy block, activation of the zygote, exchange of protamines to histones, cleavage, cell polarization, embryonic stem cell proliferation and implantation [9]. Oocytes can be collected from females with or without hormonal therapy for multiple follicular developments, by ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration known as "Ovum Pick Up" (OPU), follicular aspiration of ovaries exposed by laparotomy, follicular aspiration through laparoscopy, or by follicular aspiration of ovaries obtained from euthanized animals. The latter method is where a greater number of cumulus-oocyte complexes are obtained using sequential aspiration and dissection of the ovary [10]. However, heterologous populations of preantral and antral follicles are obtained and those that could have suffered atresia and irreversible apoptotic changes that will have repercussions and produce a decrease in the maturation rate *in vitro* [11]. For the oocytes to achieve maturation, all the molecular machinery must be regulated in space and time, thus achieving the transition from germinal vesicle to metaphase II, in addition to the production and storage of transcripts for use in fertilization and first divisions of the embryo until activation of zygotic genes [12]. The events that lead to obtaining a quality mature oocyte are given by a complex and dynamic interaction between the antral follicle and the oocyte where somatic cells (theca, granulosa and cumulus), basal lamina and Follicular Fluid (FF) participate. During this process, the oocyte must complete its final growth, and nuclear and cytoplasmic maturation [13]. *In vitro* maturation in alpacas is commonly carried out by extrapolating culture medium from cattle to alpacas, generating highly varied results [14].

The application of advanced reproductive technologies such as *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, intracytoplasmic sperm injection, *in vitro* embryo culture, cloning and transgenics require quality oocytes. Currently, there are morphological predictors for the quality of the COCs (Cumulus Oocyte Complexes) such as the compactness and thickness of the cumulus investment and brightness of the ooplasm; the granularity, coloration, inclusion and regions of organelle clustering of the cytoplasm; the shape of the polar body (round vs. Ovoid); its size (large or not); surface (smooth vs. rough); intactness (intact vs. fragmented), the thickness and organization of the zona pellucida, the size (enlarged or not) and the presence or absence of particles, of the perivitelline space; the structures and characteristics of the follicle/ovary (Follicle dimension; existence of CL with a follicle dominant or a cyst), and cellular/molecular predictors such as mitochondria (Mitochondrial distribution, Adenosine Triphosphate (ATP) and Mitochondrial DNA (mtDNA) levels), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) (G6PDH activity (BCB+ or BCB-)), calcium (Plasma membrane calcium current in the immature oocyte,

Calcium stores in mature oocyte), phosphodiesterase 3 (Intracellular phosphodiesterase 3 activity), glutathione (Intracellular glutathione level), apoptosis (Apoptosis in granulosa or in cumulus cells, Ratio of B-cell Lymphoma gene 2 (Bcl-2) to Bcl-2-Associated X protein (Bax)), Insulin-like Growth Factor (IGF) and Insulin-like Growth Factor Binding Protein (IGFBP) (Concentrations of IGF-1 and IGFBP-1 in FF; IGF-I/IGFBP-1 ratio in serum or FF; expression profile of low-molecular-weight IGFBPs (IGFBP4 and IGFBP5) in FF), super family of transforming growth factor beta (Inhibin levels in FF; activin A level in FF; basal levels of anti-Müllerian hormone in serum), steroids (Ratio of oestradiol/testosterone or oestradiol/progesterone) in FF; level of oestradiol, LH, progesterone or prolactin in FF), oxidative stress (Quantity of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in granulosa cells; level of nitric oxide, lipid peroxides, total anti-oxidant capacity and reactive oxygen species (ROS) in FF), leptin (Leptin levels in FF or serum) and gene expression profiles (Expression of hyaluronic acid synthase 2, cyclo-oxygenase 2 and gremlin 1 in cumulus cells; relative abundance of pentraxin 3 in cumulus) [15]. In alpacas, few predictors of oocyte quality have been used, more research is required. Therefore, the objective of this study was to evaluate the selection of competent alpaca oocytes matured *in vitro* in two different culture media by morphometry, cytoplasmic, and nuclear staining.

Materials and Methods

Chemical reagents and statement of ethics

All reagents used are from Sigma-Aldrich (Burlington, USA) unless otherwise noted. All prepared media filtered prior to use (0.22 μ m; Aijiren, China). All the experimental procedures were carried out in accordance with the Animal Ethics Committee of the Universidad Nacional del Altiplano, complying with all the ethical principles of animal research.

Location and experimental animals

The experiment was carried out in the Puno region (altitude: 3 847 meters above sea level, Latitude: 15° 50'26"South, Longitude: 70° 1' 41" West). A total of 22 Alpacas (Vicugna pacos) were used, with a body condition score of 3.28 ± 0.52 (scale of 1-5) with ages between 3-5 years. Nuclear and cytoplasmic maturation analyzes performed at the Animal Reproduction Laboratory of the Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Peru.

Slaughter-derived oocytes

The alpaca ovaries (n=44) collected from the Nuñoa slaughterhouse, Puno, within 30 minutes after the sacrifice and then transported for 6 hours to the laboratory in thermoses at 33-36°C in a saline solution supplemented with streptomycin (0.05 mg/mL). At laboratory follicles larger than 3 mm aspirated with a 20G x 1-inch needle attached to a 5 mL syringe and follicles smaller than 3 mm were dissected.

Maturation culture medium

The maturation medium 1 (MM1) prepared based on media reported by Tribulo [16]. MM1 contains TCM-199, 10% (v/v) fetal calf serum, 2 μ g/mL 17 β -estradiol, 25 μ g/mL porcine Follicle-Stimulating Hormone (pFSH) (Folltropin®-V; Vetoquinol, Canada), 22 μ g/mL sodium pyruvate, 50 μ g/mL of gentamicin sulfate and 1mM of alanyl-glutamine. The maturation medium 2 (MM2) prepared based on what was reported by Saadeldin [17]. The MM2 contains TCM-199, 25 mM HEPES-buffer, 2 mM NaHCO₃, 10% (v/v) of fetal calf serum, 10 μ g/mL pFSH, 10 μ g/mL Human Corionic Gonadotropin (hCG) (Choriomon; IBSA, Switzerland), 1 μ g/mL 17 β -estradiol, 20 ng/mL Epidemic growth factor (EGF), 1 μ g/mL insulin, 0.3 μ M cysteamine, 1 mM L-glutamine, 50 μ g/mL gentamicin sulfate.

Experimental design

The cumulus-oocyte complexes (COC) were randomly distributed in the two experimental groups (MM1 and MM2) with three replicates per experiment. After *in vitro* maturation, the oocytes stripped with 1% hyaluronidase for 15 minutes at 28.5°C under conditions of 5% CO₂. Subsequently, the oocytes are distributed for nuclear and cytoplasmic maturation analyzes, as well as morphological analyzes.

Oocyte maturation

The COCs selected using a stereomicroscope and the oocytes that had more than one layer of cumulus cells were selected. The 212 selected COCs assigned to each of the two experimental groups (MM1 and MM2). Every 20-30 oocytes transferred into wells with 60 µL of maturation medium, covered with mineral oil and cultured in a portable incubator for 40 hours [18] under conditions of 5% CO₂ (produced by effervescent granules) and 38.5°C (using a thermostatic bath) [19].

Morphometry of the oocytes

The oocyte diameters, thickness of the zona pellucida and area of the perivitelline space of the experimental groups (MM1 and MM2) were compared. Photographs taken with a Leica inverted microscope camera. The mean determined and measurements were made with the ImageJ software (version 1.8.0; National Institutes of Health) (Figure 1).

Assessment of nuclear maturation

The recovered COCs exposed to a 1% hyaluronidase solution for 15 minutes at 38.5°C in 5% CO₂ and subjected to successive pipetting to separate the cells from the oocyte cluster. Then, the oocytes fixed with a solution of ethanol: glacial acetic acid (3:1) in an airtight environment for at least 48 hours at 4°C [20]. The fixed oocytes were placed from 5 to 10 oocytes between the slide and the coverslip, and a mixture of vaseline: paraffin (2: 1) placed in each corner of the coverslip. The coverslip was lightly pressed until contact made with the oocytes. The staining was carried out by capillary action with a solution of 1% orcein in 45% acetic acid for 10 minutes. The assessment of nuclear

maturation performed using a Leica inverted microscope (Leica Microsystems; Wetzlar, Germany; 40X). The oocytes are classified based on the presence of the Germinal Vesicle (VG), metaphase I (MI), metaphase II (MII) and degenerated structures (DG). Degenerated oocytes presented chromosomal aberrations, presence of diffuse or undefined chromatin (Figure 2).

Assessment of cytoplasmic maturation

Denuded oocytes incubated in a 26 µM brilliant cresyl blue (BCB) solution (Toronto Research Chemicals INC; Toronto, Canada) in phosphate buffered saline (PBS) for 90 minutes at 38.5°C in 5% CO₂ [21]. Assessment of cytoplasmic maturation performed using a Leica inverted microscope. Oocytes classified according to the presence (BCB+) or absence (BCB-) of BCB staining (Figure 3).

Statistical analysis

All statistical analyzes and graphs performed using the data analysis system for Windows (GraphPad Prism version 8.0.1 software and the Microsoft Excel data analysis tool). Student's t-test analysis performed for oocyte diameter, zona pellucida thickness, perivitelline space area, nuclear maturation, and cytoplasmic maturation for the two experimental groups. The results are presented as means ± standard deviation. A probability level of P <0.05 is considered statistically significant.

Results

Effect of the two maturation culture media on oocyte morphology

The diameter of the oocytes after *in vitro* maturation (Figure 4) were 133.42 ± 14.56 µm and 136.14 ± 15.24 µm for the MM1 and MM2 respectively. There were no significant differences (P=0.397) between the groups. On the other hand, no significant differences were observed (P=0.919) with respect to the thickness of the zona pellucida (Figure 5) in the MM1 (16.84 ± 3.96) µm and MM2 (16.73 ± 4.98) µm culture medium, but there were significant differences (P=0.0005) between the area of the perivitelline space (Figure 6) of the MM1 (11018.91 ± 2465.40) µm² and MM2 (8686.18 ± 3016.88) µm².

Effect of the two maturation culture media on oocyte nuclear maturation

Figure 7 shows the percentage of nuclear maturation of oocytes after *in vitro* maturation [22]. The metaphase II percentages were 46.08 ± 5.90% and 54.65 ± 3.0% for the MM1 and MM2 respectively. There were no significant differences (P=0.088) between the two culture mediums. The same was observed for the percentage of metaphase I (31.54% and 20.08%) germinal vesicle (8.51% and 9.01%) and degenerated structures (13.87% and 16.26%) for MM1 and MM2 respectively.

Effect of the two maturation culture media on oocyte cytoplasmic maturation

Figure 8 shows the percentage of BCB+ staining for cytoplasmic oocyte maturation after *in vitro* maturation. There were significant differences (P=0.014) between culture media in the percent of cytoplasmic maturation; oocytes cultured in MM1 (67.78 ± 4.50 %) had a lower cytoplasmic maturation compared to MM2 (77.61 ± 3.58%).

Discussion

The results of the present study are the first to describe determination of oocyte competence according to the nuclear, cytoplasmic and

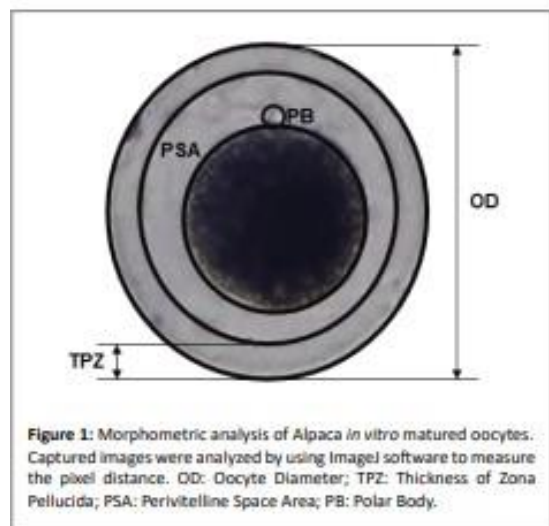


Figure 1: Morphometric analysis of Alpaca *in vitro* matured oocytes. Captured images were analyzed by using ImageJ software to measure the pixel distance. OD: Oocyte Diameter; TPZ: Thickness of Zona Pellucida; PSA: Perivitelline Space Area; PB: Polar Body.

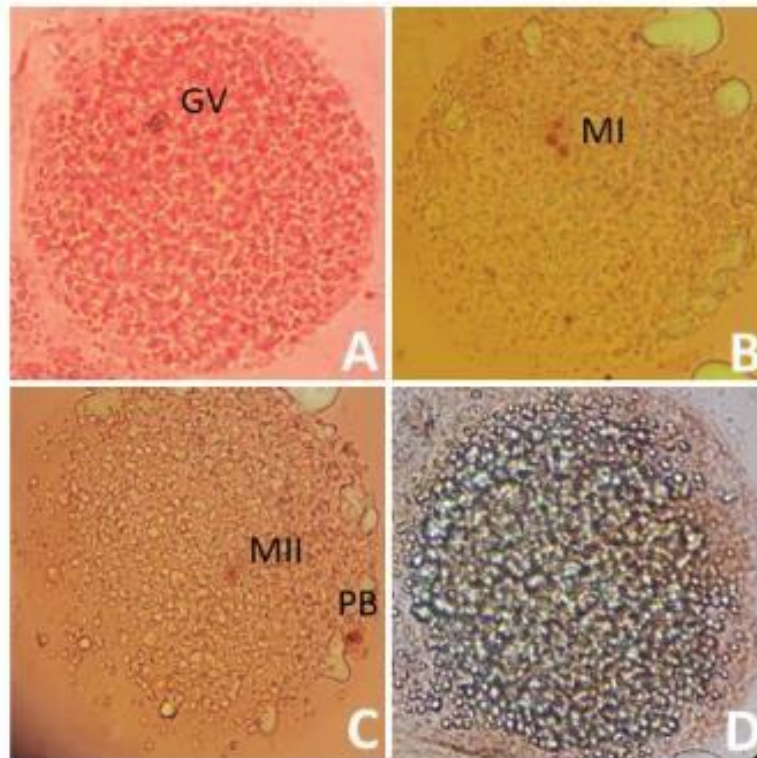


Figure 2: Classification of nuclear maturation in Alpaca oocytes. Nuclear maturation assessed using acetate-orcein staining. A) Oocyte in the germinal vesicle stage, B) Oocyte in state of metaphase I, C) oocyte in state of metaphase II and D) Degenerated oocyte. GV: Germinal Vesicle; MI: Metaphase I; MII: Metaphase II; PB: Polar Body.

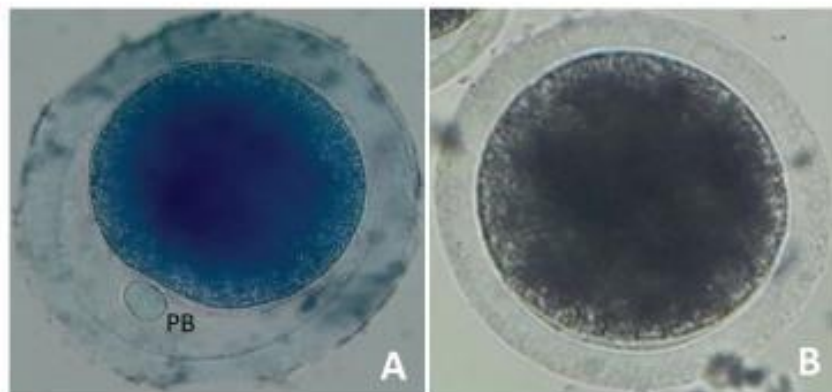
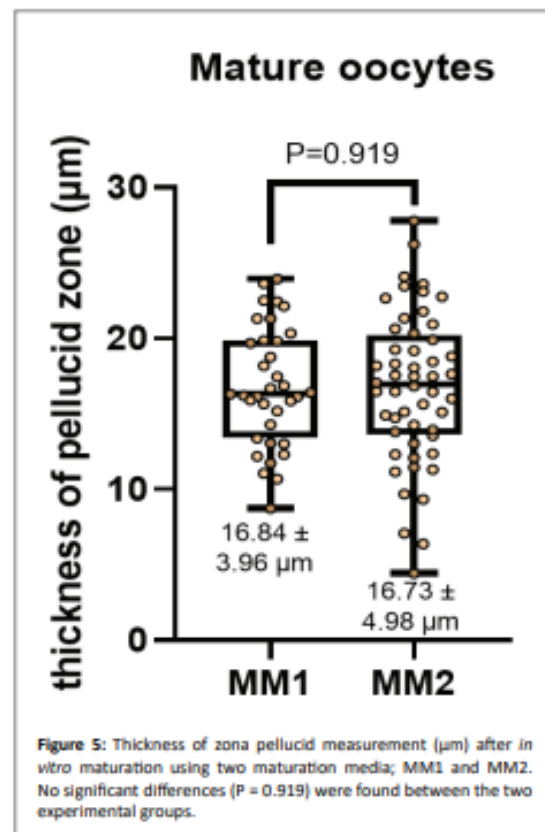
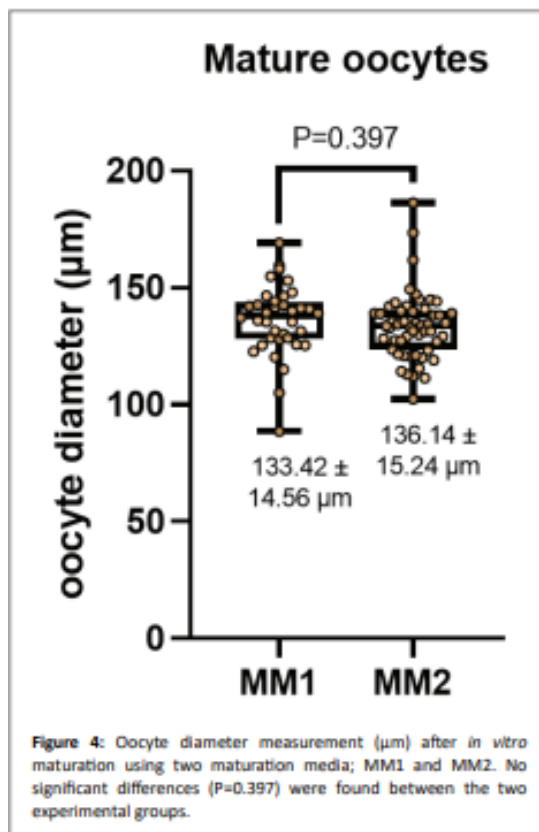


Figure 3: Classification of cytoplasmic maturation in Alpaca oocytes. Cytoplasmic maturation using BCB staining. Oocytes are classified according to the presence (A) and absence (B) of BCB staining. BCB: Brilliant Cresyl Blue; PB: Polar Body.



morphometric changes in alpaca oocytes during *in vitro* maturation comparing two different culture media. The *in vitro* maturation period was 40 hours for the two experimental groups. This value was taken according to previous work on *in vitro* maturation in alpacas [3,23,24] and camels [25,26], which resulted in high rates of metaphase II (MII) oocytes. Furthermore, it is closely related to high rates of blastocyst formation after *in vitro* fertilization. The use of longer periods generates a higher rate of degenerated oocytes. The recovery of oocytes is of great importance to carry out advanced studies in reproductive biotechnology. There are few slaughterhouses in the world where alpacas are slaughtered, being the Puno region where there is the largest population of alpacas in Peru, and the district of Nuñoa the place where the greatest quantity is slaughtered. However, limited animal material is available for laboratory experimentation. It is for this reason that two sequential oocyte collection procedures were used to obtain the highest possible performance, which first consists of the aspiration of follicles using 5 mL syringes larger than 3 mm and then dissection of the ovaries to obtain follicles smaller than 3 mm. The aspiration using only a syringe or vacuum pump (commonly applied in other domestic species) [27], shows a low recovery rate in alpacas. This is mainly attributed to the ovary structure of the alpacas and camels [25].

The incubators used for *in vitro* culture recreate the *in vivo* conditions in the process of maturation, fertilization and embryonic

development. Different technological strategies have been designed that vary depending on the rate of embryos obtained and the economic factor [28]. In previous studies carried out in our laboratory, it was shown that there are no significant differences between a conventional incubator and a portable one in obtaining bovine embryos [19]. The latter uses effervescent granules as a supply of CO₂ (5%) and a thermostatic bath as a temperature regulator (38.5°C). Additionally, in highland conditions, fluctuations in ambient temperature vary from -7 to 18°C [29]. These extreme temperature changes make the use of conventional incubators less viable than incubators with a thermostatic bath. Since the latter response much better to sudden changes in ambient temperature.

In our investigation to determine oocyte competence after *in vitro* maturation according to nuclear, cytoplasmic maturation and morphometric, two culture media were used (MM1 [16] and MM2 [17]). In most studies carried out in alpacas, MM1 is generally used for maturation; however, until now it was not known whether it was the most efficient maturation medium. According to our results, MM2 has a higher yield than MM1 both in nuclear maturation (46.08 ± 5.90% for MM1 and 54.65 ± 3.0% for MM2) and in cytoplasmic maturation (67.78 ± 4.50 for MM1 and 77.61 ± 3.58 % for MM2), although only significant differences were found in cytoplasmic maturation. On the other hand, our results are within the range reported by other researchers. In alpacas, nuclear maturation of 65.8 ± 8.1% at 38 h [30],

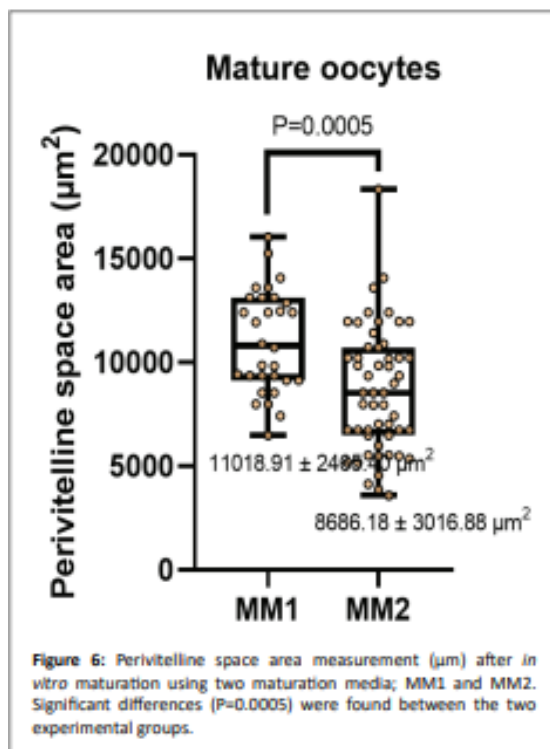


Figure 6: Perivitelline space area measurement (μm) after *in vitro* maturation using two maturation media; MM1 and MM2. Significant differences ($P=0.0005$) were found between the two experimental groups.

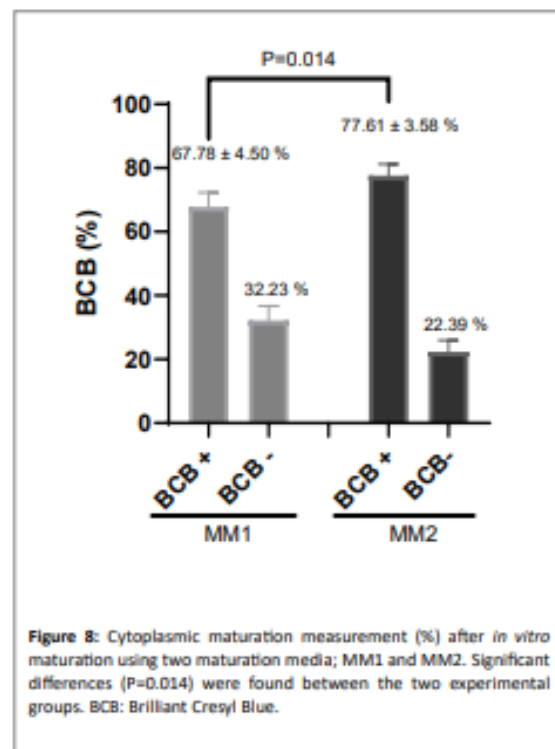


Figure 8: Cytoplasmic maturation measurement (%) after *in vitro* maturation using two maturation media; MM1 and MM2. Significant differences ($P=0.014$) were found between the two experimental groups. BCB: Brilliant Cresyl Blue.

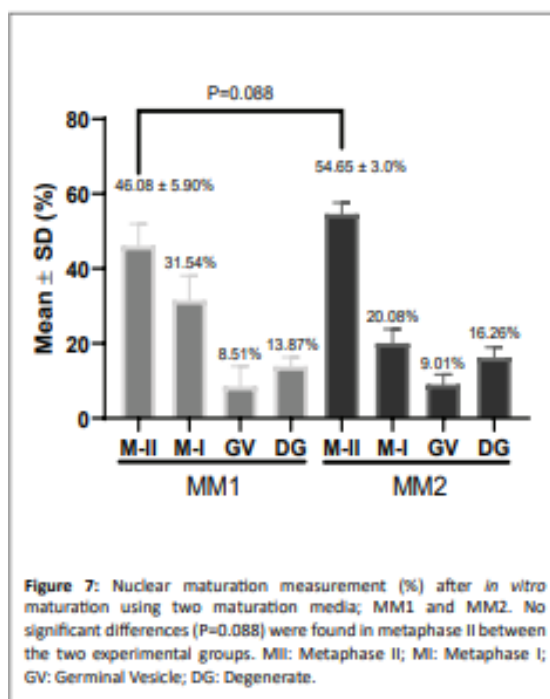


Figure 7: Nuclear maturation measurement (%) after *in vitro* maturation using two maturation media; MM1 and MM2. No significant differences ($P=0.088$) were found in metaphase II between the two experimental groups. MII: Metaphase II; MI: Metaphase I; GV: Germinal Vesicle; DG: Degenerate.

65.1 \pm 5.7% at 32 h by syringe aspiration [7], 75.3 \pm 11.9% at 42 h [18], 57.6% using follicles larger than 2 mm, supplemented with fetal bovine serum 10 % (v/v) are reported and animals older than 11 years [14], 64.9% \pm 8.1%, in the presence of 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FSH for 42 h [23], 46.9% using 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 15 IU/mL [31], 74.2%, 2 IU/mL of eCG and 10 IU/mL of hCG [32]. In llamas, 70.53 \pm 3.75%, 42 hours [33]. In dromedary camels, 81.6 \pm 0.8% supplemented with FCS 10% (v/v) at 30-32 hours [34], 61% using TCM-199 medium, cultured at 40-42 h, slaughterhouse oocytes and using the dissection method [25], 71% at 42 h [35]. In alpacas, cytoplasmic maturation studies have not yet been reported, being the first in this study. However, in cattle, rates of 80.3% [36] and 77.75% have been obtained by aspirating follicles from 4 to 8 mm using OPU [21]. Furthermore, in this same study, no significant differences were found in animals with and without super ovulation treatment.

According to our morphometric studies performed on oocytes matured with two maturation media, for the case of oocyte diameter 136.14 \pm 15.24 μm and 133.42 \pm 14.56 μm , thickness of zona pellucida 16.73 \pm 4.98 μm and 16.84 \pm 3.96 μm , area of the perivitelline space 8686.18 \pm 3016.88 μm^2 and 11018.91 \pm 2465.40 μm^2 using MM2 and MM1 respectively. No reference works were found in alpacas. However, in dromedary camelids there is a morphometric study with oocyte diameter 145.93 \pm 0.85 μm and 141 \pm 0.87 μm , the thickness of zona pellucida 10.52 \pm 0.31 μm and 10.76 \pm 0.38 μm , for oocytes with first polar and degenerated bodies respectively [26]. Comparing these studies shows that oocytes with a larger diameter and a thinner zona pellucida are related to quality oocytes and a high fertilization rate [37], obtaining better results with the MM2. In the case of the area of

the perivitelline space, it is known that a greater area is related to a low fertilization rate [38], having better oocyte quality results using MM2.

The differences between the culture media are due to their composition and concentration of the reagents used in each of the culture media. Regarding the concentration of pFSH, there are 25 µg/ml compared to 10 µg/ml, 17β-estradiol of 2 µg/ml against 1 µg/ml for MM1 and MM2 respectively. However, MM1 does not contain hCG or EGF in its composition, these molecules being crucial to obtain competent oocytes from alpacas. Since, hCG participates in the molecular mechanism of maturation and EGF participates in the molecular mechanism of oocyte growth. On the other hand, the administration of cysteamine and insulin in MM2 helps in cellular detoxification and in the energy metabolism of the oocyte. We recommend conducting more studies using these reagents individually and collectively, as well as, supplementing with cytokines such as fibroblast growth factor, insulin-like growth factor, leukemia inhibitory factor, among others. At the same time to carry out studies of the molecular mechanisms that sublate the signaling of the aforementioned molecules. Likewise, it is recommended to carry out complementary studies with predictors of oocyte quality at the molecular level.

Conclusion

The present study shows that MM2 presents better results in the cytoplasmic maturation and area of the perivitelline space. However, nuclear maturation, the diameter of the oocyte and thickness of the zona pellucid did not show significant differences between the culture media. This is due to the fact that MM2 contains epidermal growth factor, human chorionic gonadotropin, cysteamine and insulin in its composition that participate directly and indirectly in obtaining competent oocytes from alpacas.

Acknowledgments

The authors thank the District Municipality of Nuñoa for facilitating the entrance to the slaughterhouse in their jurisdiction. Likewise, to INIA-Donoso and Vivanco International S.A.C. for the training provided. This study was financed by the National Council of Science, Technology and Innovation (Concytec), which is an entity attached to the Presidency of the Council of Ministers in Peru.

Author Contributions

DHM: Conceptualization, supervision, methodology and data curation; performed experiments, statistical analysis, interpretation of data, writing original draft, reviewing and editing the final version. **FWG:** Conceptualization, supervision, methodology and data curation; performed experiments, final version review. **MGP:** Conceptualization, supervision, methodology and data curation; performed experiments and final version review. **BDV:** Conceptualization, supervision, methodology and data curation, final version review. **HWV:** Conceptualization, supervision, methodology and data curation; performed experiments and final version review.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

References

1. Brown BW (2000) A review on reproduction in South American camelids. *Anim Reprod Sci* 58: 169-195.
2. Trasorras V, Giuliano S, Miragaya M (2013) *In vitro* production of embryos in South American camelids. *Anim Reprod Sci* 136: 187-193.

3. Miragaya MH, Chaves MG, Agüero A (2006) Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Rumin Res* 61: 299-310.
4. Fernandez-Baca S, Hansel W, Novoa C (1970) Embryonic Mortality in the Alpaca. *Biol Reprod* 3: 243-251.
5. Martorell HP (2000) Biotecnología del trasplante y micromanipulación de embriones de bovinos y camélidos de los Andes.
6. Gamarra G, Huaman E, León S, Carpio M, Alvarado E, et al. (2008) First *in vitro* embryo production in alpacas (Lama Pacos). *Reprod Fertil Dev* 21: 177-178.
7. Ruiz J, Paulo Santayana R, José Mendoza M, Leandra Landeo J, Huamán E, et al. (2017) Effect of oocyte maturation time, sperm selection method and oxygen tension on *in vitro* embryo development in alpacas. *Theriogenology* 95: 127-132.
8. Skidmore JA, Crichton EG, Malo CM, Vaughan JL, Wani NA, et al. (2020) Reproductive technologies in camelids.
9. Plant TM, Zeleznik AJ (2015) *Knobil and Nell's Physiology of Reproduction. Volume 1*, Elsevier.
10. Del Campo MR, Del Campo CH, Donoso MX, Berland M, Mapletoft RJ (1994) *In vitro* fertilization and development of llama (Lama glama) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology* 41: 1219-1229.
11. Moniruzzaman M, Miyano T (2010) Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals. *J Reprod Dev* 56: 559-566.
12. Kitajima TS, Ohsugi M, Ellenberg J (2011) Complete kinetochore tracking reveals error-prone homologous chromosome biorientation in mammalian oocytes. *Cell* 146: 568-581.
13. Hennet ML, Combelles CMH (2012) The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *Int J Dev Biol* 56: 819-831.
14. 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.
15. Wang Q, Sun QY (2007) Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reprod Fertil Dev* 19: 1-12.
16. Tribulo P, Rivera RM, Ortega Obando MS, Jannaman EA, Hansen PJ (2019) Production and Culture of the Bovine Embryo. *Methods Mol Biol* 2006: 115-129.
17. Saadeldin IM, Swelum AAA, Alowalmer AN (2019) *In vitro* Culture of Camelid Embryos. *Methods Mol Biol* 2006: 209-218.
18. Huanca LW, Condori PR, Chileno MM, García HP, Cainzo CJ, et al. (2014) Evaluación de Cuatro Tiempos de Cultivo sobre la Tasa de Maduración y División Post-Fecundación *in vitro* de Ovocitos de Alpaca. *Rev Investig Vet Del Perú* 25: 468-476.
19. Pérez Durand MG, Villalta BQ, Perez Guerra UH (2019) Producción de embriones *in vitro* en una incubadora portátil de dióxido de carbono y viabilidad *in vivo* post transferencia a vacas receptoras. *Rev Investig Altoandinas-J High Andean Res* 21: 249-256.
20. Simões LMS, Santos APC, Bottino MP, Lima EA, Fernandes UR, et al. (2021) Nuclear maturation kinetics and *in vitro* fertilization of immature bovine oocytes injected into pre-ovulatory follicles. *Theriogenology* 166: 90-96.
21. Ayala L, Samaniego J, Nieto P, Rodas R, Dután J, et al. (2018) Competence of the oocyte obtained by ovum pick-up as evaluated by the bright cresyl blue test. *Rev Investig Vet Del Peru* 29: 552-558.

22. Huanca W, Condori R, Cainzos J, Chileno M, Quintela L, et al. (2009) *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* 22: 327.
23. Condori RL, Huanca W, Chileno M, Cainzo J, Valverde F, et al. (2011) Effect of follicle-stimulating hormone addition on *in vitro* maturation and cleavage of alpaca (*Vicugna Pacos*) Embryos. *Reprod Fertil Dev* 23: 224.
24. Huanca W, Condori R, Chileno M, García P, Cainzo J, et al. (2014) Evaluación de Cuatro Tiempos de Cultivo sobre la Tasa de Maduración y División Postfecundación *in vitro* de Ovocitos de Alpaca. Effect of time of incubation on nuclear maturation and cleavage post *in vitro* fertilization of alpaca oocytes. *Rev Inv Vet Perú* 25: 468-476.
25. Nowshari MA (2005) The effect of harvesting technique on efficiency of oocyte collection and different maturation media on the nuclear maturation of oocytes in camels (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology* 63: 2471-2481.
26. Saadeldin IM, Swelum AAA, Yaqoob SH, Alowalimer AN (2017) Morphometric assessment of *in vitro* matured dromedary camel oocytes determines the developmental competence after parthenogenetic activation. *Theriogenology* 95: 141-148.
27. Gordon I (2003) *Laboratory production of cattle embryos*. Biotechnology in agriculture N°27. CABI publishing.
28. Suzuki T, Sumantri C, Khan NH, Murakami M, Saha S (1999) Development of a simple, portable carbon dioxide incubator for *in vitro* production of bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 54: 149-157.
29. Sanabria J, Lhomme JP (2013) Climate change and potato cropping in the Peruvian Altiplano. *Theor Appl Climatol* 112: 683-695.
30. Huanca W, Condori R, Cainzos J, Chileno M, Quintela L, et al. (2010) *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* 22: 327.
31. Ulises S, Quispe Gutiérrez, Teodosio Huanca Mamani, Luis V, Olivera Marocho (2019) Influencia de las hormonas folículo estimulante, luteinizante y gonadotropina coriónica equina en la maduración *in vitro* de ovocitos y clivaje de embriones de alpaca. *Rev Investig LA Esc Posgrado* 974-985.
32. Torres P, Humberto M (2017) Efecto de las gonadotropinas en la maduración y fertilización de ovocitos en alpacas (*Vicugna pacos*).
33. Ayuque Araujo A, Huamancayo J, Ciro E (2013) Evaluación de diferentes tiempos para la maduración nuclear de ovocitos de llamas (*Lama glama*) en el desarrollo de embriones producidos por fecundación *in vitro*. Huancavelica.
34. Moulavi F, Hosseini SM (2019) Effect of macromolecule supplement on nuclear and cytoplasmic maturation, cryosurvival and *in vitro* embryo development of dromedary camel oocytes. *Theriogenology* 132: 62-71.
35. Kafi M, Mesbah F, Nili H, Khalili A (2005) Chronological and ultrastructural changes in camel (*Camelus dromedarius*) oocytes during *in vitro* maturation. *Theriogenology* 63: 2458-2470.
36. Argudo DE, Tenemaza MA, Merchán SL, Balboa JA, Méndez MS, et al. (2020) Intraovarian influence of bovine corpus luteum on oocyte morphometry and developmental competence, embryo production and cryotolerance. *Theriogenology* 155: 232-239.
37. Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Milingos S, Dendrinos S, et al. (1999) Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 72: 240-244.
38. Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, et al. (2008) Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertil Steril* 90: 1692-1700.