



EFECTO DE FACTORES EMBRIOTRÓFICOS A DIFERENTES TENSIONES DE OXÍGENO EN CULTIVO *IN VITRO* SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE ALPACAS HASTA LA ETAPA DE BLASTOCISTO

EFFECT OF EMBRYOTROPHIC FACTORS AT DIFFERENT OXYGEN TENSION FOR
IN VITRO CULTURE ON THE EMBRYONIC DEVELOPMENT OF ALPACAS UP TO
THE BLASTOCYST STAGE

Teodosio Huanca Mamani 

Programa de Introducción a la Investigación en Medicina y Sanidad Veterinaria, Instituto Nacional de Innovación Agraria, Perú.

*Autor para correspondencia: teodosiohuancamamani@gmail.com

Manuscrito recibido el 10 de octubre de 2020. Aceptado, tras revisión, el 30 de septiembre de 2021. Publicado el 1 de septiembre de 2022.

Resumen

La alpaca es el camélido sudamericano doméstico de mayor importancia para el Perú, país que a nivel regional cuenta con el 87% de estos animales. Ya que las formas tradicionales de reproducción no garantizan su calidad genética, la reproducción *in vitro* es una alternativa para su mejoramiento. Este estudio evaluó la influencia de los factores embriotróficos de desarrollo epidérmico (EGF) y de crecimiento insulínico (IGF-1) y tensiones de oxígeno en el desarrollo *in vitro* de ovocitos de alpaca hasta la etapa de blastocistos. A partir de ovarios de animales sacrificados, se obtuvieron ovocitos que se colocaron en medio TCM-199, suplementado con piruvato de sodio, glutamina, estradiol (E2), hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), factor embriotrófico (EGF o IGF-1), 5% de suero fetal bovino y gentamicina (10 μ L/mL) durante 32 horas, a 38,5 °C, con 5% de CO₂ y humedad relativa mayor de 95%, con tensiones O₂ entre 6 y 20%. Posteriormente, los ovocitos fueron fecundados con semen fresco y cultivados en medio KSOMaa durante 48 horas. Los cultivos fueron diferenciados por factores de crecimiento (EGF e IGF-1) y tensiones de O₂ (6% y 20%), más el grupo control sin suplementar con EGF o IGF-I, para valorar las tasas de división de ovocitos y blastocistos a partir de ovocitos. Mediante análisis de conglomerados, se establecieron diferencias significativas entre los tratamientos con $\alpha = 0,05$ para cada variable de respuesta, observándose la mayor tasa de divisiones de ovocitos (24,8%) con EGF a 6% de O₂ y la mayor producción de blastocistos/ovocito (18,4%) con IGF-1 a 6% de O₂. Se concluye que la adición de factores embriotróficos y una baja tensión de O₂ son favorables para el desarrollo embrionario *in vitro* en alpacas.

Palabras clave: Alpaca, camélidos, clivaje, fertilización, ovocitos, reproducción.

Abstract

The alpaca is the most important South American domestic camelid for Peru, a country that regionally has 87% of these animals. Since traditional forms of reproduction do not guarantee its genetic quality, *in vitro* reproduction is an alternative for its improvement. This study evaluated the influence of embryotrophic factors of epidermal development (EGF) and insulin-like growth factor (IGF-1) and oxygen tension on the *in vitro* development of alpaca oocytes up to the blastocyst stage. From ovaries of sacrificed animals, oocytes were obtained and placed in TCM-199 medium, supplemented with sodium pyruvate, glutamine, estradiol (E2), follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), embryotrophic factor (EGF or IGF-1), 5% fetal bovine serum and gentamicin (10 μ L/mL) for 32 hours, at 38.5 °C, with 5% CO₂ and relative humidity greater than 95%, with O₂ tensions between 6 and 20%. Subsequently, the oocytes were fertilized with fresh semen and cultured in KSOMaa medium for 48 hours. Cultures were differentiated by growth factors (EGF and IGF-1) and O₂ tensions (6% and 20%), plus the control group without EGF or IGF-I supplementation, to assess oocyte and blastocyst division rates from oocytes. By cluster analysis, significant differences were established between treatments with $\alpha = 0.05$ for each response variable, with the highest rate of oocyte divisions (24.8%) with EGF at 6% O₂ and the highest blastocyst/oocyte production (18.4%) with IGF-1 at 6% O₂. It is concluded that the addition of embryotrophic factors and low O₂ tension are favorable for *in vitro* embryo development in alpacas.

Keywords: Alpaca, camelids, cleavage, fertilization, oocytes, reproduction.

Forma sugerida de citar: Huanca Mamani, T. (2022). Efecto de factores embriotróficos a diferentes tensiones de oxígeno en cultivo *in vitro* sobre el desarrollo embrionario de alpacas hasta la etapa de blastocisto. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*. Vol. 36(2):113-121. <http://doi.org/10.17163/lgr.n36.2022.09>

ID Orcid:

Teodosio Huanca Mamani: <http://orcid.org/0000-0001-5881-8671>

1 Introducción

En Suramérica, la cría de camélidos domésticos como llamas (*Lama glama*) y alpacas (*Vicugna pacos*) forma parte de una cultura ancestral, sobre todo en Perú y Bolivia, países que cuentan con el 98,89% de la población total de alpacas (87,9% Perú y 10,9% Bolivia) y el 93,4% del total de llamas (60,8% Bolivia y 32,5% Perú), según cifras reportadas por el Ministerio de Agricultura y Riego del Perú (MINAGRI) (MINAGRI, 2015). En el caso del Perú, se reporta una población de 3 685 516 alpacas y de 1 257 000 llamas, por lo que los estudios genéticos y reproductivos de estas especies son de suma importancia para el país, debido a su gran potencial productivo y comercial, sobre todo de la alpaca, basado en la producción de fibra, carne, piel y estiércol como abono orgánico, además de su uso como animal para recreación y producción de sueros terapéuticos (MINAGRI, 2019). Según el último censo agropecuario del Perú realizado en el año 2012 por el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI), las regiones con mayor densidad de alpacas son Puno con 39,6%, Cusco con 14,8% y Arequipa con 12,7%; la variedad Huacaya representa el 80,4% de la población total (INEI, 2013).

A pesar de la importancia de las alpacas para el Perú, su reproducción se realiza principalmente por monta natural, sin considerar la variabilidad genética y el mejoramiento de la especie con fines comerciales, lo que ha llevado a una disminución de la calidad genética (Huanca, 2012). Así, la reproducción *in vitro* se muestra como una alternativa viable para el mejoramiento genético y el aumento de la productividad de la alpaca, ya que esta técnica está altamente desarrollada en bufalinos, bovinos, ovinos y porcinos (Liang y col., 2020; Javvaji y col., 2020; Dubeibe y col., 2019; Gonella Diaz y col., 2013; Rodrigues y col., 2013). Asimismo, se ha reportado la factibilidad de la reproducción de camélidos por inseminación artificial, transferencia de embriones y fertilización *in vitro* (Ruiz, 2018; Pérez, Zevallos y Perez, 2017; Pacheco, Vélez y Pezo, 2016), siendo necesario el estudio de las condiciones que permitan el desarrollo exitoso de la reproducción de alpacas mediante técnicas *in vitro*, de suma importancia para la región andina, ya que no existen protocolos específicos para ello.

Puesto que la producción *in vitro* de embriones

es limitada, debido a la reducida sobrevivencia tanto embrionaria como fetal y la elevada frecuencia de anomalías fetales, placentarias o neonatales, se buscan alternativas que mejoren la producción de embriones con esta técnica, dirigiendo la atención a los factores de crecimiento que, en condiciones *in vivo*, regulan los procesos de mitogénesis, diferenciación y apoptosis celular (Block, 2007; Kane, Morgan y Coonan, 1997).

Los factores de crecimiento o factores embriotróficos más empleados en estudios experimentales para aumentar la eficacia de maduración de los ovocitos y la producción *in vitro* de embriones son el factor de crecimiento insulínico (Insulin growth factor, IGF), por sus efectos en el crecimiento, desarrollo y maduración folicular inducida por las gonadotropinas (Lenz, Benavides y Uribe-Velásquez, 2007) y contribución a la pre-implantación y desarrollo del embrión en bovinos (Lima y col., 2006; Stefanello y col., 2006; Block, 2007), el factor de crecimiento epidérmico (Epidermal growth factor, EGF), que estimula la proliferación y diferenciación celular (Adams, 1999), y que le relaciona con la maduración ovocitaria (Harper y Brackett, 1993), el factor de crecimiento transformador (Transforming growth factor, TGF) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (Platelet-derived growth factor, PDGF) (Block, 2007).

Por otra parte, los mejores rendimientos de cultivos embrionarios se obtienen con concentraciones de O₂ más bajas que la atmosférica, debido al menos parcialmente, a la reducción de la generación de radicales libres de O₂, reduciendo su efecto deletéreo (Legge y Sellens, 1991; Noda y col., 1991; Umaoka y col., 1992). Además, la reducida tensión de O₂ intrauterina, reportada en estudios *in vivo*, implicaría una protección a la pre-implantación del blastocisto (Clark y col., 2006). Así, se ha reportado un mejor desarrollo de ovocitos bovinos madurados en 5% de O₂ (Hashimoto y col., 2000; Van Blerkom, Antczak y Schrader, 1997).

Con estos antecedentes, se buscó establecer las condiciones idóneas para el desarrollo embrionario de alpacas al evaluar la influencia de los factores embriotróficos EGF e IGF-1 y la tensión de oxígeno al 6% y 20% sobre la tasa de división de ovocitos post primer cultivo embrionario de 48 h en medio KSOMaa, y la tasa blastocistos a partir de ovocitos

post siete días de segundo cultivo embrionario en SOFaa.

2 Materiales y Métodos

2.1 Lugar del estudio

La investigación se realizó en el Centro de Investigaciones y Producción (CIP) Quimsachata, de la estación experimental agraria ILLPA – Puno, del Instituto Nacional de Innovación Agraria-INIA – Perú, ubicada entre los distritos de Santa Lucía y Cabanillas de las provincias de Lampa y San Román en la región Puno, 15° 44' 00" Latitud Sur y 70° 41' 00" Longitud Oeste, en la zona agroecológica denominada puna seca, con una altitud promedio de 4300 msnm, y una temperatura que fluctúa entre 2 °C (mayo a julio) y 15 °C (septiembre a diciembre) (Díaz, 2013).

2.2 Colección de las muestras de ovarios

La recolección de ovarios se realizó a partir de animales beneficiados en el camal del distrito de Nuñoa, con un muestreo aleatorio que no consideró el estado reproductivo de las alpacas. Los ovarios colectados se colocaron y transportaron en un termo, entre 35 y 37 °C, sumergidos en solución salina al 0,9% y suplementada con gentamicina (10 µL/mL).

2.3 Procesamiento de los ovocitos

Utilizando el método Slicing modificado (Lorenzo y col., 2015) se colectaron 1051 ovocitos, seleccionados en las categorías I y II. Para su maduración, los ovocitos se colocaron en medio TCM-199, suplementado con piruvato de sodio, glutamina, estradiol (E2), hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), factor embriotrófico (EGF o IGF-1) en concentraciones entre 10 y 50 ng/ml, 5% de suero fetal bovino y gentamicina (10 µL/mL) durante 32 horas, a 38,5 °C, con 5% de CO₂ y humedad relativa mayor de 95%, con tensiones O₂ de 6% o 20%. En la tabla 1 se observa la distribución de los ovocitos en función de la inclusión de factores embriotróficos y la tensión de O₂.

Tabla 1. Distribución de ovocitos de alpacas

Factor Embriotrófico	Tensión de oxígeno %	N° de Ovocitos
EGF	6	205
	20	219
IGF-I	6	206
	20	210
Control	6	211
	20	211

Posterior a la maduración, los ovocitos fueron trasladados a un medio de fecundación (FER-TALP suplementado con 0.25 mM de piruvato sodio, 6mg/ml de BSA y 50 µg/mL de gentamicina), en el que fueron lavados tres veces. Paralelamente se realizaba la capacitación espermática, mediante lavados en Sperm-TALP suplementado con 1,0 mM piruvato de sodio, 3 mg/ml de BSA fracción V y 50 µg/mL de gentamicina con 4 µL de heparina y 30 µL de PHE/ (penicilamina, hipotaurina y epinefrina) y centrifugado a 1500 rpm/10 min. El pellet así formado fue resuspendido en 1mL del medio FERT – TALP.

La fecundación *in vitro* se realizó con espermatozoides provenientes de un macho de probada fertilidad, que luego de capacitados fueron transferidos a gota de 80 µL del medio de fecundación y se colocaron en incubadora durante 10 horas.

2.4 Desarrollo del embrión

Al finalizar el periodo de fecundación, los posibles cigotos fueron retirados de las gotas de fecundación e introducidos a placas multipocillos con 500 µL de medio de cultivo KSOM-AA, donde se adicionaron EGF o IGF-1 (10-50 10 y 50 ng/ml) a 38,5 °C, máxima humedad relativa >95%, tensión de CO₂ del 5% y 6 o 20% de tensión de O₂. La tasa de división de cigotos fue evaluada 48 horas después de la fecundación y luego fueron trasladados al medio de cultivo SOFaa, adicionando EGF o IGF-1 bajo las condiciones ya mencionadas. Al día siete posterior a la fecundación, se observaron los estadios de blastocisto.

2.5 Tratamiento estadístico de los datos

El experimento combinó los factores embriotróficos EGF IGF-1 y un grupo control con dos niveles de

tensión de O₂ (6 y 20%). Para establecer las diferencias y similitudes de la aplicación conjunta de los tratamientos sobre las tasas de divisiones de ovocitos y de blastocistos obtenidos a partir de ovocitos (blastocistos /ovocitos), se utilizó el análisis de conglomerados por distancia Euclidiana para vecinos más cercanos con un nivel de confianza de 95%. Esta técnica permite la agrupación de las variables de acuerdo a sus distancias, en clústeres entre los que no existe diferencia significativa de acuerdo a lo establecido en el análisis, ya que son excluyentes respecto a los factores que no pertenecen al grupo, no estableciéndose jerarquías, sino grupos diferen-

ciados estadísticamente (Cuadras, 2020). Se utilizó el paquete estadístico InfoStat versión 2018 para todos los análisis estadísticos.

3 Resultados y Discusión

3.1 Tasa de división de ovocitos

Una vez desarrollado el experimento, se observó que la menor tensión de O₂ (6%) produjo la mayor tasa de división de ovocitos y formación de blastocistos por ovocito, en comparación con el grupo control y 20% de O₂. (Tabla 2)

Tabla 2. Tasas de división de ovocitos y blastocistos por ovocito tras la aplicación de EGF e IGF-I con dos tensiones de O₂.

Factor Embriotrófico	Tensión de O ₂ (%)	Divisiones Ovocitos (%)	Blastocistos/Ovocitos (%)
EGF	6	51(24,9)	29(14,1)
	20	13 (5,9)	12 (5,5)
IGF-I	6	42(20,4)	38(18,4)
	20	24(11,4)	14(6,7)
Control	6	33(15,6)	6 (2,8)
	20	33(15,6)	6 (2,8)

Del mismo modo, el porcentaje de divisiones de ovocitos (24,9%) fue mayor con el factor embriotrófico EGF con 6% de O₂, menor al reportado por Benavides, Huanca y Quintanilla (2015), quienes, al analizar la influencia de la tensión de oxígeno sobre el desarrollo embrionario bovino, obtuvieron el 69,7% de divisiones de ovocitos con 5% de O₂. Sin embargo, estos autores no evalúan el efecto de EGF; en tanto Ahumada (2011), con adición de EGF, obtuvo el 74,15% de clivaje en ovocitos bovinos cultivados a 5% de O₂.

En la figura 1, el dendrograma correspondiente a divisiones de ovocitos presenta tres clústeres como grupos que difieren significativamente cuando se toma el corte de acuerdo al resultado de la distancia cofenética calculada en 0,72. Se destaca un clúster con los tratamientos de EGF e IGF-1 con 6% de O₂, que al encontrarse separados del grupo control con diferentes tensiones de O₂, indicaría que EGF e IGF-I aumentan significativamente la división de ovocitos, aunque entre los factores embriotróficos no hubo diferencias con dicha tensión de O₂. Por

otra parte, que el IGF-I con 20% de tensión de O₂ forme un clúster con el grupo control, con ambas tensiones de O₂ sugeriría que IGF-I, bajo estas condiciones, no afecta la división de ovocitos, mientras que el tratamiento EGF con 20% de O₂ ejercería un efecto inhibitorio sobre esta variable.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Delgado (2018), que con 2% de O₂ observó mayor división de ovocitos y mejora en la calidad de embriones bovinos que con el 5% y 20% de O₂ en la atmósfera de cultivo. Del mismo modo, Arias y col. (2007) reporta resultados similares a la investigación actual, aplicado a embriones de bovinos; bajo condiciones de alta (20%) y baja (7%) tensión de O₂. Al respecto, estudios en ovinos y porcinos han concluido que la ausencia de O₂ promueve la capacidad de activarse y mejora la partenogénesis de los ovocitos en cultivos *in vitro* (Iwamoto y col., 2005; Loren y col., 2016; Yao y col., 2019).

En contraste, He y col. (2020) reportaron que la tasa de escisión de ovocitos de yak fue significativa-

mente menor ($P < 0,05$) con una concentración de O_2 al 5% que con concentraciones de 10% y 20%, mejorando la maduración y la competencia del desarrollo de los ovocitos. Por otra parte, Rodrigues y col. (2013) no observaron que la división de ovocitos ca-

minos sea afectada por tensiones de O_2 de 5% o 20%. Las diferencias entre estos resultados probablemente se expliquen, al menos parcialmente, por las características propias del desarrollo embrionario de estas especies.

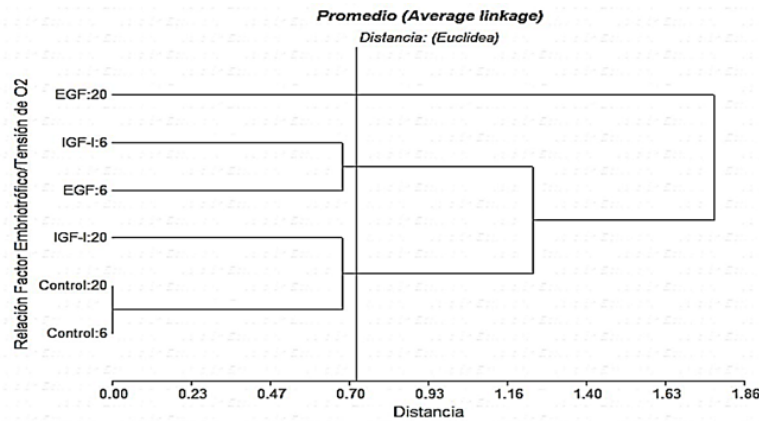


Figura 1. Dendrograma de conglomerados para la variable respuesta número de divisiones de ovocitos

3.2 Tasa de blastocistos a partir de ovocitos

La figura 2 muestra el dendrograma del análisis de conglomerados con cuatro clústeres bien definidos con el corte de acuerdo a la distancia cofenética de 0,48, indicando que existen diferencias significativas entre los tratamientos experimentales y el grupo control con ambas tensiones de O_2 , es decir que

el empleo de EGF e IGF-1 con 6 y 20% de O_2 incrementa la formación de blastocistos. Por otra parte, el porcentaje de blastocistos/ovocito obtenido, es superior al 14,0% reportado por Soto-Martínez y col. (2019), también con embriones bovinos evaluados en medio líquido oviductal sintético secuencial, evitando la acumulación de sustancias embriotóxicas a tensión máxima de 5% de O_2 .

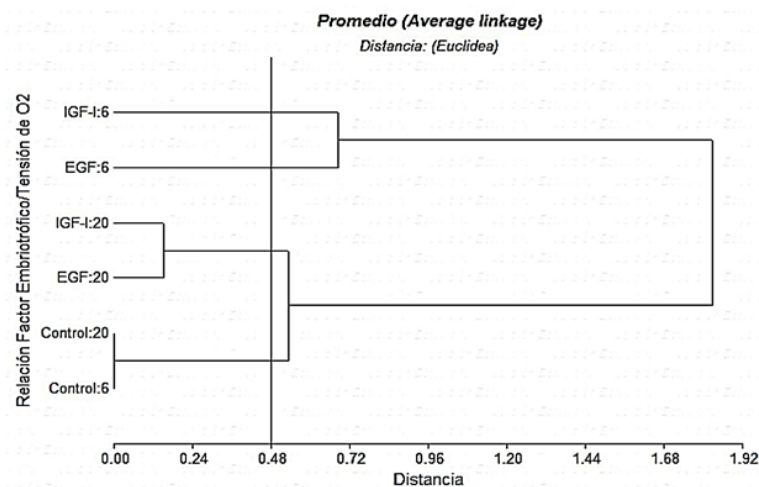


Figura 2. Dendrograma de conglomerados para la variable respuesta número de blastocistos por ovocitos

Ahora bien, el número de blastocistos por ovocitos no fue modificado por EGF e IGF-I al utilizar una tensión de O₂ de 20% por lo que se ubicaron en el mismo clúster, mientras que el factor embriotrófico IGF-1 al 6% de tensión de O₂ registró el mayor número de blastocistos por ovocitos (18,4%); este resultado es similar al reportado por Sirisathien y Brackett (2003), quienes obtuvieron en bovinos, un mayor número de blastocistos por ovocitos con IGF-1 que con EGF; es decir, proporciones similares de ovocitos activados partenogénicamente se convirtieron en blastocistos que en los ovocitos inseminados (28,8%). Asimismo, Yong y col. (2017), destacaron la importancia del tratamiento con factores de crecimiento para la maduración *in vitro* de ovocitos de porcinos, lo que es consistente con los resultados del presente estudio.

En cuanto al efecto del IGF-1, Javvaji y col. (2020) informan que la adición de este factor mejoró significativamente la maduración de ovocitos ovinos en comparación con ovocitos no tratados, al regular la expresión de PI3K/Akt y la señalización de apoptosis, los cuales están relacionados con la activación de los ovocitos en ovinos. Finalmente, la adición del factor de crecimiento epidérmico (EGF) al medio de maduración estimula la maduración de los ovocitos; pero sólo la complementación con EGF incrementa el desarrollo embrionario y de blastocisto; esta evidencia está en concordancia con Richani y Gilchrist (2018), quienes determinaron que la red EGF también domina la traducción de las transcripciones maternas en el ovocito inactivo, una fase que es integral para la competencia del ovocito. Además, hay analogía con el estudio de Salgado, Simanca y Vergara (2013), demostrando que hubo diferencia significativa ($p < 0,05$) de la EGF sobre la proporción de ovocitos, explicando la mayor proporción de ovocitos bajo tratamiento con 50 ng/mL.

4 Conclusiones

La tasa de división *in vitro* de los ovocitos de alpacas cultivados en medio KSOM-AA y de formación de blastocistos en medio SOFaa, ambos con adición de factores embriotróficos (EGF e IGF-1), se vieron favorecidos por baja tensión de oxígeno (6%), con resultados significativos respecto a los grupos control, observándose mayor porcentaje de divisiones

de ovocitos con el tratamiento EGF y en blastocistos por ovocito con el tratamiento IGF-1.

Si bien el uso de los factores embriotróficos EGF e IGF-1 y las bajas tensiones de O₂ generó un aumento en el número de divisiones y número de blastocistos por ovocitos, indicando que bajo las condiciones de este estudio pueden emplearse para una mejora en el desarrollo embrionario *in vitro* en alpacas, es necesario disponer de información adicional que permita dilucidar los mecanismos de acción de los factores embriotróficos, con el fin de optimizar el procedimiento y lograr una reproducción de alpacas *in vitro* viable que lleve al mejoramiento genético de la especie.

Referencias

- Adams, G. (1999). «Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants». En: *Journal of Reproduction and Fertility-Supplement* 54, 17-32. Online: <https://bit.ly/3s03x3s>.
- Ahumada, C. (2011). «Efecto de factores de crecimiento en el cultivo sobre el desarrollo y calidad de embriones bovinos producidos *in vitro* en grupos reducidos». Tesis de máster. Universidad Politécnica de València. Online: <https://bit.ly/3c9LTnl>.
- Arias, C. y col. (2007). «Efecto de la suplementación con alanina y glicina sobre los clivajes iniciales de embiones bovinos producidos *in vitro*». En: *Revista MVZ Córdoba* 12.2, 1020-1027. Online: <https://bit.ly/3hMGIvF>.
- Benavides, L., W. Huanca y L. Quintanilla (2015). «Efecto del Método de Colección y Tensión de Oxígeno sobre el Desarrollo de Ovocitos Bovinos Fecundados y Cultivados *in vitro*». En: *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 26.4, 596-603. Online: <https://bit.ly/3FfARt4>.
- Block, J. (2007). «Use of insulin-like growth factor-1 to improve post-transfer survival of bovine embryos produced *in vitro*». En: *Theriogenology* 68, S49-S55. Online: <https://bit.ly/3CdzNEc>.
- Clark, A. y col. (2006). «Mathematical modelling of oxygen concentration in bovine and murine cumulus-oocyte complexes». En: *Reproduction* 131.6, 999-1006. Online: <https://bit.ly/3navdCy>.
- Cuadras, C. (2020). *Nuevos métodos de análisis multi-variante*. Noveduc Libros.

- Delgado, G. (2018). «Efecto de tres niveles de oxígeno en la atmósfera de cultivo y la adición de un antioxidante comercial en el desarrollo de embriones bovinos producidos in vitro». En: *Acta universitaria* 28.2, 53-57. Online: <https://n9.cl/c3h9tr>.
- Díaz, R. (2013). *Estudio de caracterización climática de la precipitación pluvial y temperatura del aire para la cuenca de los ríos Coata e Ilave*. Inf. téc. SENAMHI-Puno. Online: <https://bit.ly/3pTDmtx>.
- Dubeibe, D. y col. (2019). «Importance of lipid metabolism on oocyte maturation and early embryo development: Can we apply what we know to buffalo?». En: *Animal reproduction science* 211, 106220. Online: <https://bit.ly/3qAPWRW>.
- Gonella Diaza, Á. y col. (2013). «Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro». En: *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* 4.1, 65-80. Online: <https://bit.ly/3pTCIfB>.
- Harper, K. y B. Brackett (1993). «Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins». En: *Biology of reproduction* 48.2, 409-416. Online: <https://n9.cl/k9xwl>.
- Hashimoto, S. y col. (2000). «Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes». En: *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* 57.4, 353-360. Online: <https://bit.ly/3ncpMTy>.
- He, H. y col. (2020). «Low oxygen concentrations improve yak oocyte maturation and enhance the developmental competence of preimplantation embryos». En: *Theriogenology* 156, 46-58. Online: <https://bit.ly/3qE1QKW>.
- Huanca, W. (2012). «Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos como alternativas para la mejora genética». En: *XVI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal, Asociación Venezolana de Producción Animal*.
- INEI (2013). *Resultados definitivos del IV censo nacional agropecuario – 2012*. Inf. téc. Instituto Nacional de Estadística e Informática del Perú. Online: <https://bit.ly/3bgK20K>.
- Iwamoto, M. y col. (2005). «Low oxygen tension during in vitro maturation of porcine follicular oocytes improves parthenogenetic activation and subsequent development to the blastocyst stage». En: *Theriogenology* 63.5, 1277-1289. Online: <https://bit.ly/2YM8BPp>.
- Javvaji, P. y col. (2020). «IGF-1 treatment during in vitro maturation improves developmental potential of ovine oocytes through the regulation of PI3K/Akt and apoptosis signaling». En: *Animal biotechnology*, 1-8. Online: <https://bit.ly/30k9RJR>.
- Kane, M., P. Morgan y C. Coonan (1997). «Peptide growth factors and preimplantation development». En: *Human reproduction update* 3.2, 137-157. Online: <https://bit.ly/3qDqICI>.
- Legge, M. y M. Sellens (1991). «Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture». En: *Human Reproduction* 6.6, 867-871. Online: <https://n9.cl/fimv6>.
- Lenz, M., G. Benavides y L. Uribe-Velásquez (2007). «Papel del factor de crecimiento semejante a insulina-1 (IGF-1) en la regulación de la función ovárica». En: *Biosalud* 6, 149-159. Online: <https://bit.ly/3DjiH9c>.
- Liang, Y. y col. (2020). «Effects of L-carnitine on embryo development of vitrified swamp buffalo oocytes following in vitro fertilization». En: *Livestock Science* 232, 103933. Online: <https://bit.ly/2YOyIFm>.
- Lima, PF y col. (2006). «Effect of retinoids and growth factor on in vitro bovine embryos produced under chemically defined conditions». En: *Animal reproduction science* 95.3-4, 184-192. Online: <https://bit.ly/3onrh0y>.
- Loren, P. y col. (2016). «Modulación del estado de óxido-reducción por peróxido de hidrógeno en la etapa de maduración ovocitaria: efecto sobre el desarrollo embrionario en bovinos». En: *International Journal of Morphology* 34.2, 431-435. Online: <https://n9.cl/5ris2>.
- Lorenzo, M. y col. (2015). «Comparación de dos técnicas para la obtención de complejos cumulus ovocito porcinos». En: *InVet* 17.1, 25-34. Online: <https://bit.ly/30IHAmM>.
- MINAGRI (2015). *Población y producción animal*. Inf. téc. Ministerio de Agricultura y Riego del Perú.
- MINAGRI (2019). *Potencial productivo y comercial de la alpaca*. Inf. téc. Ministerio de Agricultura y Riego del Perú. Online: <https://bit.ly/3Dq1Ql8>.
- Noda, Y. y col. (1991). «Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block». En: *Molecular reproduction and development* 28.4, 356-360. Online: <https://bit.ly/3Ch4ZSU>.

- Pacheco, J., V. Vélez y D. Pezo (2016). «Evaluación de la eficiencia de la transferencia de embriones interespecie entre alpacas y llamas obtenidos por ovulación simple». En: *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 27.1, 64-69. Online: <https://n9.cl/c5lz8>.
- Pérez, M., J. Zevallos y U. Perez (2017). «Comparación de sistemas de cultivo de embriones de alpacas». En: *Revista de Investigaciones Altoandinas* 19.2, 157-164. Online: <https://bit.ly/3Htz59J>.
- Richani, D. y R. Gilchrist (2018). «The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence». En: *Human reproduction update* 24.1, 1-14. Online: <https://bit.ly/3DoNf9O>.
- Rodrigues, B. y col. (2013). «Similar patterns of embryo development in canine oocytes cultured in vitro at oxygen tensions of 5 and 20%». En: *Theriogenology* 79.8, 1224-1228. Online: <https://bit.ly/3nljK2U>.
- Ruiz, B. (2018). «In vitro production and transfer of embryos in South American Camelids: New opportunities and challenge». En: *Spermova* 8.1, 54-60. Online: <https://bit.ly/3FsGyEp>.
- Salgado, R., J. Simanca y O. Vergara (2013). «Efecto del factor de crecimiento epidermal (EGF) sobre la maduración de ovocitos bovinos cultivados In vitro». En: *Revista Científica* 23.4, 325-328. Online: <https://bit.ly/3wRf15J>.
- Sirisathien, S. y B. Brackett (2003). «TUNEL analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I». En: *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* 65.1, 51-56. Online: <https://bit.ly/3oDfYkS>.
- Soto-Martínez, Y. y col. (2019). «Desarrollo embrionario de bovino in vitro cocultivado con células oviductales y del cumulus oophorus». En: *Revista de Salud Animal* 41.1, 1-8. Online: <https://bit.ly/2YUytsr>.
- Stefanello, J. y col. (2006). «Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development». En: *Theriogenology* 66.9, 2068-2076. Online: <https://bit.ly/3cgI3sJ>.
- Umaoka, Y. y col. (1992). «Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos». En: *Molecular reproduction and development* 31.1, 28-33. Online: <https://bit.ly/30Cbtzc>.
- Van Blerkom, J., M. Antczak y R. Schrader (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.» En: *Human reproduction* 12.5, 1047-1055. Online: <https://bit.ly/3nouc9Y>.
- Yao, X. y col. (2019). «Kaempferol attenuates mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by H₂O₂ during porcine embryonic development». En: *Theriogenology* 135, 174-180. Online: <https://bit.ly/3qJ7LOQ>.
- Yong, H. y col. (2017). «Treatment of epidermal growth factor (EGF) enhances nuclear maturation of porcine oocytes and stimulates expression of ER/Golgi transport proteins». En: *Development & reproduction* 21.2, 131-138. Online: <https://bit.ly/3nlOJfb>.