



***In vitro* fertilization of alpaca oocytes, post-maturation supplemented with follicle-stimulating hormone and equine chorionic gonadotropin**

Fertilización *in vitro* de ovocitos de alpaca, post maduración suplementados con hormona folículo estimulante y gonadotropina coriónica equina

Quispe-Gutiérrez Ulises S.¹, Soncco-Quispe Juan R.² y Aguilar-Paniura Otilia S.³

<https://orcid.org/0000-0002-9039-2276>¹, <https://orcid.org/0000-0001-6505-4630>² y <https://orcid.org/0009-0004-6156-7411>³

¹ Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Perú – usquispe@unamba.edu.pe

² Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Perú – jsoncco@unamba.edu.pe

³ Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Perú – 121193@unamba.edu.pe

(Recepción: 05/03/2023 - Aceptación 21/06/2023)

Abstract. The objective of this study was to evaluate *in vitro* matured alpaca oocytes, supplemented with different concentrations of follicle stimulating hormone (FSH) and equine chorionic gonadotropin (eCG) and to determine embryonic segmentation, post *in vitro* fertilization. Oocytes were recovered from the ovaries of sacrificed alpacas, those of category A and B were matured *in vitro* for 36 h in TCM-199 medium, supplemented with hormones distributed in treatments (T), being T1: FSH (0.05 UI mL⁻¹) + eCG (40 UI mL⁻¹) and T2: FSH (0.1 UI mL⁻¹) + eCG (40 UI mL⁻¹), then fertilized and cultured *in vitro* for up to two days. The number of oocytes in metaphase II was similar ($P > 0.05$) between T1 and T2 (62.9 ± 6.8 vs $66.3 \pm 5.7\%$). The embryonic segmentation rate was similar ($P > 0.05$) between T1 and T2 (47.4 ± 4.9 vs $53.9 \pm 8.3\%$). In conclusion, the supplementation of FSH plus eCG, in the concentrations of this study, present similar rates of oocyte maturation *in vitro* and embryonic cleavage in alpacas.

Keywords: Oocyte, *Lama pacos*, camelid.

Resumen. El objetivo de este estudio fue evaluar los ovocitos de alpaca madurados *in vitro*, con suplemento de diferentes concentraciones de hormona folículo estimulante (FSH) y gonadotropina coriónica equina (eCG) y determinar la segmentación embrionaria, post fertilización *in vitro*. Se recuperaron ovocitos de ovarios de alpacas sacrificadas, los de categoría A y B se maduraron *in vitro* durante 36 h en medio TCM-199, suplementado con hormonas distribuidos en tratamientos (T), siendo T1: FSH (0.05 UI mL⁻¹) + eCG (40 UI mL⁻¹) y T2: FSH (0.1 UI mL⁻¹) + eCG (40 UI mL⁻¹), luego fertilizados y cultivados *in vitro* hasta dos días. La cantidad de ovocitos en metafase II fue similar ($P > 0.05$) entre T1 y T2 (62.9 ± 6.8 vs $66.3 \pm 5.7\%$). La tasa de segmentación embrionaria fue similar ($P > 0.05$) entre T1 y T2 (47.4 ± 4.9 vs $53.9 \pm 8.3\%$). En conclusión, la suplementación de FSH más eCG, en las concentraciones de este estudio, presentan similares tasas de maduración de ovocitos *in vitro* y segmentación embrionaria en alpacas.

Palabras clave: Oocito, *Lama pacos*, camélido.

1 Introducción

La producción de embriones *in vitro* (PIVE) de los animales orientado a la investigación y comercio, en los últimos años, está en crecimiento. La PIVE comprende la maduración, fertilización *in vitro* de ovocitos y cultivo de embriones. La calidad genética, entre otros factores, está relacionada directamente con la fertilidad, que cada vez es más afectada [1]. La biotecnología reproductiva de PIVE, como una alternativa para obtener animales de alto valor genético en menor tiempo; aún

no es eficiente en camélidos, avanza lentamente frente a otras especies [2]. Uno de los factores que afecta esta tecnología son los medios de maduración de ovocitos, fertilización y cultivo de embriones *in vitro* que aún están en etapas iniciales de estudio. Las tasas de maduración *in vitro* de ovocitos son menores, cuando no se usa gonadotropinas como suplemento en medio de maduración [3]- [5].

Los medios de cultivo afectan la maduración *in vitro* de ovocitos, fertilización y clivaje de embriones. La suplementación con gonadotropinas en medio de maduración afecta la maduración de ovocitos *in vitro*, por lo que, las gonadotropinas probablemente sean fundamentales en la maduración de ovocitos. La adición combinada de FSH y eCG a los medios de cultivo induce mayor maduración nuclear y citoplasmática del ovocito de búfalos, que cuando se FSH o eCG solos [6]. Las hormonas para su mecanismo de acción requieren receptores, se encontraron expresión de mRNA de los receptores del FSH en las células de cúmulos de ovocitos durante la maduración *in vitro* [7]. Por ello, se plantea como hipótesis que el suplemento de FSH más eCG en diferentes concentraciones mejoraría la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca repercutiendo en la segmentación embrionaria. Hay estudios sobre fertilización *in vitro* de ovocitos de alpaca con fines de PIVE; sin embargo, estos estudios no son suficientes. Por tanto, se planteó el presente estudio con la finalidad de evaluar la combinación de FSH y eCG en la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca y la segmentación embrionaria.

2 Método

Colección de ovarios. Los ovarios se obtuvieron de las alpacas postmortem, fueron transportados al laboratorio en termo a 36 a 37 °C, siguiendo el protocolo por Del Campo et al. [8], estos fueron sumergidos en solución salina (NaCl) al 0.09% suplementados con estreptomicina 100 µg mL⁻¹ y penicilina 100 UI mL⁻¹.

Recuperación de ovocitos. Los ovocitos fueron recuperados por aspiración folicular de folículos de aproximadamente 2 a 6 mm de diámetro, utilizando jeringa de 10 mL con agujas de 21 G, cuyo contenido folicular se colocó a un tubo cónico de 15 mL, el sedimento se colocó a una placa de Petri que contenía solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con albúmina de suero bovino (BSA) al 2% y mantenidas a 37 °C.

Evaluación de ovocitos. Los ovocitos se evaluaron utilizando un estereomicroscopio a 2x o 4x con platina térmica a 37 °C, se lavaron en gotas sucesivas de PBS + BSA. Luego los ovocitos fueron clasificados de acuerdo con la descripción previa de Hawk y Wall [9], que clasifica a los ovocitos en tres tipos, categoría A: buena calidad; categoría B: calidad intermedia; categoría C: mala calidad.

Maduración *in vitro* de ovocitos. Los ovocitos de alpaca de categoría A y B se distribuyeron al azar en dos tratamientos. Los ovocitos seleccionados se lavaron en gotas sucesivas con Tissue Culture Medium 199 (TCM-199), luego se transfirieron al medio de maduración compuesto por TCM-199 con HEPES 10 mM, NaHCO₃ 2.0 mM suplementado con suero fetal bovino al 10%, piruvato de sodio 0.2 mM, cisteína 0.6 mM, glutamina 0.25 mM, 10 ng mL⁻¹ EGF; 1 µg mL⁻¹ de 17 β estradiol, 5 µg mL⁻¹ de LH, 0.05 o 0.1 UI mL⁻¹ de FSH más 40 UI mL⁻¹ de eCG, 50 µg mL⁻¹ de gentamicina. Los ovocitos se incubaron en gotas de 80 µL (10 a 20 ovocitos por gota) en placas Petri (30 x 15 mm) cubiertas con aceite mineral durante 36 h a 38.5 °C, con una atmósfera con 5% de CO₂ y alta humedad.

Evaluación de la maduración de ovocitos. La maduración de los ovocitos se evaluó según descrito previamente por Ruiz et al. [10] con ciertas modificaciones. Los ovocitos se retiraron de la incubadora y se colocaron en gotas de PBS y se transfirieron a viales de 0.5 mL. A continuación, las células del cúmulo se eliminaron mediante agitación por 3 min. Los ovocitos se lavaron con gotas de PBS y se colocaron en una solución fijadora compuesta por ácido acético/etanol (1:3; v:v) durante 48 h. La tinción de ovocitos se realizó de acuerdo a la descripción previa de Huanca et al. [11] con algunas modificaciones. Los ovocitos en grupos de 5 a 10 se sumergieron en PBS y se colocaron en portaobjetos y se cubrieron con cubreobjetos. Los ovocitos se tiñeron con orceína al 1% (p:v) en ácido acético al 45% (v:v) y se examinó su estado nuclear en metafase II utilizando un microscopio con un aumento a 400x.

Sobre fertilización *in vitro*. Los ovocitos madurados se fertilizaron *in vitro* con espermatozoides epididimarios, obtenidos mediante cortes de la cola del epidídimo, los que fueron colocados a placas Petri con contenido de Sperm-TALP (2 mM CaCl_2 , 3.1 mM KCL, 0.4 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.3 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 21.6 mM ácido láctico, 100 mM NaCl, 1 mM piruvato de sodio, 25 mM NaHCO_3 , 10 mM HEPES, 0.6% (w/v) BSA Fracción V [12]. La capacitación espermática se completó mediante la técnica Swing-up [13]. Posteriormente, el sedimento final del semen se suspendió con Fert-TALP (2 mM CaCl_2 , 3.2 mM KCL, 0.5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 11 mM ácido láctico, 114 mM NaCl, 0.2 mM piruvato de sodio, 25 mM NaHCO_3 , 20 mM penicilamina, 10 mM hipotaurina, 1 mM epinefrina, 0.6 % (p/v) BSA libre de ácidos grasos [12] y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ heparina y 50 mg mL^{-1} de gentamicina, hasta una concentración final de 1.0×10^6 espermatozoides mL^{-1} . Los ovocitos expandidos se lavaron con PBS suplementado con BSA y luego se transfirieron a gotas de 80 μL de Fert-TALP con suspensión de espermatozoides y se cubrieron con aceite de mineral. Los gametos fueron co-incubados a 38.5 °C con una atmósfera con 5% de CO_2 y alta humedad durante 18 h [10].

Cultivo *in vitro* de embriones. Los presuntos cigotos post fertilización *in vitro* fueron desnudados por agitación durante 3 min, lavados SOFm-Hepes y luego cultivados en grupos de 20-30 en 80 μL de medio SOFaa suplementado con 10% de SFB, 1 mM L-glutamina, 10% de insulina y 50 mg mL^{-1} de gentamicina [14], cultivados en las mismas condiciones de incubadora de CO_2 descritos para la fertilización *in vitro*. La segmentación embrionaria se evaluó el día 2 del cultivo *in vitro*.

2.1 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software estadístico InfoStat (2020e). Se comprobó la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk y homogeneidad de varianzas con Levene, se transformaron los datos a valores angulares cuando fueron necesarios. Para el modelo estadístico, se consideró como variable independiente a las concentraciones de FSH más eCG, siendo las variables de respuesta el porcentaje de maduración de ovocitos y el porcentaje de segmentación embrionaria. Se realizó el análisis de varianza. Se consideró que hubo diferencia cuando $P \leq 0.05$.

3 Resultados

Sobre la Maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca, los resultados se muestran en la Tabla 1. En la maduración de ovocitos de alpaca *in vitro*, utilizando gonadotropinas FSH y eCG, se encontró similar ($P > 0.05$) cantidad de ovocitos en metafase II con el tratamiento de 0.1 UI mL^{-1} de FSH en combinación con 40 UI mL^{-1} de eCG y el tratamiento 0.05 UI mL^{-1} de FSH sola ($P \leq 0.05$).

Tabla 1. Promedio de porcentaje ($\pm$ desviación estándar) de maduración nuclear de ovocitos de alpaca madurados *in vitro* suplementados con diferentes concentraciones de FSH y eCG ($P > 0.05$).

Tratamiento	Réplicas	Ovocitos (n)	Maduración nuclear (n; media $\pm$ DS)	
			MII	
FSH (0.05 UI mL^{-1}) + eCG (40 UI mL^{-1})	6	190	117 (62.9 $\pm$ 6.8)	
			117	6.3 $\pm$ 5.69)
FSH (0.1 UI mL^{-1}) + eCG (40 UI mL^{-1})	6	177		

En la segmentación embrionaria post fertilización *in vitro*, los resultados de la segmentación de presuntos cigotos después de la fertilización *in vitro* de ovocitos de alpaca, se muestran en la Tabla 2. La tasa de segmentación embrionaria fue similar ($P > 0.05$) entre el tratamiento de 0.05 UI mL^{-1} de FSH más 40 UI mL^{-1} de eCG versus tratamiento 0.1 UI mL^{-1} de FSH más 40 UI mL^{-1} de eCG.

Tabla 2. Promedio ($\pm$ desviación estándar) de segmentación de presuntos cigotos después de la fertilización *in vitro* de ovocitos de alpaca ($P > 0.05$).

Tratamiento	Réplicas	Presuntos cigotos	Segmentados (n)	Tasa de segmentación (% $\pm$ DS)
FSH (0.05 UI mL ⁻¹) + eCG (40 UI mL ⁻¹)	5	196	95	47.4 $\pm$ 4.9
FSH (0.1 UI mL ⁻¹) + eCG (40 UI mL ⁻¹)	5	180	92	117.9 $\pm$ 8.3

4 Discusiones Conclusiones

Los resultados del presente estudio muestran que las combinaciones 40 UI mL⁻¹ de eCG con 0.05 o 0.1 UI mL⁻¹ de FSH presentan similar porcentaje de maduración de ovocitos en MII. Resultados similares se muestran en estudios previos utilizando diferentes concentraciones de FSH en alpacas [15], [16]. La suplementación con FSH mejora la maduración *in vitro* de ovocitos de cabra y produce ovocitos maduros para fertilización *in vitro* [17]. Este efecto positivo de la FSH se atribuiría al incremento de la expresión de mRNA de los receptores del FSH en las células cúmulos del ovocito, como se informó cuando se adicionó FSH en medio de maduración *in vitro* de ovocitos yak (*Bos grunniens*) [7]. Por otro lado, los dos tratamientos de gonadotropinas con diferentes concentraciones de FSH más eCG realizados en el presente estudio, no muestran diferencias significativas, probablemente no habría sinergismo entre las dos hormonas; aunque, otro estudio informa que la combinación de FSH y eCG aumentó el porcentaje de maduración *in vitro* de ovocitos de búfalos en contraste con usar solo FSH o eCG [6], dado que la eCG tiene actividad como FSH y LH en especies distintas a la equina, se une a los receptores de FSH [18]. Estas diferencias podrían atribuirse a las varias concentraciones de las gonadotropinas usadas en cada estudio. Por consiguiente, queda realizar más investigaciones utilizando diferentes concentraciones de gonadotropinas en la maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca. La tasa de segmentación encontrada en el presente estudio, para las diferentes concentraciones de FSH y eCG utilizadas en medio de maduración *in vitro*, fueron similares. Estos resultados son respaldados por estudios en alpaca, donde encontraron 46.2% [19], 45.2 y 42.1% [20] de tasas de división embrionaria. Inclusive hay reportes de tasa de clivaje más altos en alpacas 66.6% [21], 79.3% [10]. En estos estudios utilizaron FSH en medio de maduración, pero no usaron eCG. En general, las gonadotropinas adicionadas al medio de maduración *in vitro* de ovocitos posiblemente estarían involucradas en las expresiones de mRNA de los receptores de FSH y LH, sin embargo, los efectos en la fecundación *in vitro* de ovocitos y el desarrollo embrionario temprano no están claros; por tanto, el uso de la eCG adicional a la FSH todavía es controversial, por lo que requiere más estudios.

Se concluye que la suplementación de FSH más eCG, en las concentraciones de este estudio, alcanzan similares tasas de maduración de ovocitos *in vitro* y segmentación embrionaria en alpacas.

5 Biografías

Los dos primeros autores son profesores de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, adscritos al Departamento Académico de Medicina Veterinaria y Zootecnia, involucrados en temas de reproducción animal, la tercera autora es egresada de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

6 Agradecimientos

Se agradece por el financiamiento del presente estudio al: Segundo concurso de proyectos de investigación básica y aplicada para docentes con financiamiento de fondos del canon minero, 2018 de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

7 Referencias

- [1] T. Huanca, “Efecto de la administración de gonadotropinas exógenas (FSH y eCG en la respuesta ovárica y la producción de embriones en alpacas (vicugna pacos),” Universidad de Santiago de Compostela, 2008.
- [2] A. Tibary, A. Anouassi, and H. Khatir, “Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids,” *Theriogenology*, vol. 64, no. 3, pp. 618–638, Aug. 2005, doi: [10.1016/j.theriogenology.2005.05.016](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.016)
- [3] X. Wang, T. Tsai, J. Qiao, Z. Zhang, and H. L. Feng, “Impact of gonadotropins on oocyte maturation, fertilisation and developmental competence in vitro,” *Reprod. Fertil. Dev.*, vol. 26, pp. 752–757, 2013, doi: [10.1071/RD13024](https://doi.org/10.1071/RD13024)
- [4] R. Salgado, Ó. Vergara, and L. Ramírez, “Effect of gonadotropins on the maturation and embryo development of bovine oocytes cultured in vitro,” *Rev. MVZ Córdoba*, vol. 15, no. 1, pp. 1954–1960, 2010. <https://doi.org/10.21897/rmvz.333>
- [5] C. Galli and R. M. Moor, “Gonadotrophin Requirements for the In Vitro Maturation of Sheep and Their Subsequent Embryonic Development,” *Theriogenology*, vol. 36, no. 6, pp. 1083–1093, 1991. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90356-I](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90356-I)
- [6] A. Khadr, A. Abdou, A. El-Sherbiny, and A. Abdoon, “Effect of Culture Media, Gonadotropins, Proteins, Growth Factors and Hyaluronic Acid on In-Vitro Maturation of Buffalo Oocytes,” *J. Anim. Poult. Prod.*, vol. 13, no. 7, pp. 91–97, 2022, doi: [10.21608/jappmu.2022.145223.1043](https://doi.org/10.21608/jappmu.2022.145223.1043)
- [7] X. Xiao *et al.*, “Effect of addition of FSH, LH and proteasome inhibitor MG132 to in vitro maturation medium on the developmental competence of yak (*Bos grunniens*) oocytes,” pp. 1–7, 2014. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-30>
- [8] M. Del Campo, C. Del Campo, M. Donoso, M. Berland, and R. Mapletoft, “In vitro fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture,” *Theriogenology*, vol. 41, no. 6, pp. 1219–1229, Jan. 1994, doi: [10.1016/0093-691X\(94\)90479-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90479-3)
- [9] H. W. Hawk and R. J. Wall, “Improved yields of bovine blastocysts from in vitro produced oocytes. I. selection of oocyte and zygotes,” *Theriogenology*, vol. 41, no. 8, pp. 1571–1583, 1994. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90822-Z](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90822-Z)
- [10] J. Ruiz *et al.*, “Effect of oocyte maturation time, sperm selection method and oxygen tension on in vitro embryo development in alpacas,” *Theriogenology*, vol. 95, pp. 127–132, 2017, doi: [10.1016/j.theriogenology.2017.03.006](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.006)
- [11] W. Huanca L., R. Condori P., M. Chileno M., P. García H., J. Cainzo C., and J. J. Becerra G., “Evaluación de cuatro tiempos de cultivo sobre la tasa de maduración y división posfecundación in vitro de ovocitos de alpaca,” *Rev. Investig. Vet. del Perú*, vol. 25, no. 4, pp. 468–476, 2014, doi: [10.15381/rivep.v25i4.10782](https://doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10782)
- [12] B. D. Bavister and Yanagimachi, “The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro,” *Biol. Reprod.*, vol. 16, no. 2, pp. 228–237, 1977, doi: [10.1095/biolreprod16.2.228](https://doi.org/10.1095/biolreprod16.2.228)
- [13] M. Shamsuddin, H. Rodriguez-Martinez, and B. Larsson, “Fertilizing capacity of bovine spermatozoa: Selected after swim-up in hyaluronic acid-containing medium,” *Reprod. Fertil. Dev.*, vol. 5, no. 3, pp. 307–315, 1993, doi: [10.1071/RD9930307](https://doi.org/10.1071/RD9930307)
- [14] L. Landeo *et al.*, “Oocyte Quality, In Vitro Fertilization and Embryo Development of Alpaca Oocytes Collected by Ultrasound-Guided Follicular Aspiration or from Slaughterhouse Ovaries,” 2022. <https://doi.org/10.3390/ani12091102>
- [15] R. L. Condori *et al.*, “Effect of follicle-stimulating hormone addition on in vitro maturation and cleavage of alpaca (*Vicugna pacos*) embryos,” *Reprod. Fertil. Dev.*, vol. 23, no. 1, p. 224, 2010. <https://doi.org/10.1071/RDv23n1Ab252>
- [16] W. Huanca *et al.*, “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.*, vol. 22, no. 1, p. 327, 2010, doi: [10.15381/rivep.v25i4.10782](https://doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10782)
- [17] D. T. Widayati and M. Pangestu, “Effect of follicle-stimulating hormone on Bligon goat oocyte maturation and embryonic development post in vitro fertilization,” vol. 13, pp. 2443–2446, 2020. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2443-2446>
- [18] B. D. Murphy and S. D. Martinuk, “Equine Chorionic Gonadotropin,” *Endocr. Rev.*, vol. 12, no. 1, pp. 27–44, 1991, doi: [10.1210/edrv-12-1-27](https://doi.org/10.1210/edrv-12-1-27)
- [19] I. Arriaga C, W. Huanca L, M. Terreros C, J. J. Becerra G, P. García H, and A. Ampuero B, “Efecto de Temperatura y Tiempo de Almacenamiento de Ovarios de Alpacas sobre la Tasa de Maduración y división in vitro de Ovocitos,” *Rev. Investig. Vet. del Perú*, vol. 25, no. 4, pp. 477–486, 2014, doi: [10.15381/rivep.v25i4.10783](https://doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10783)
- [20] W. Huanca *et al.*, “In vivo maturation and in vitro fertilization of alpaca oocytes,” *Reprod. Fertil. Dev.*, vol. 23, no. 1, pp. 204–205, 2010. <https://doi.org/10.1071/RDv23n1Ab211>

- [21] J. Ruiz, L. Landeo, J. Mendoza, J. Correa, M. Silva, and M. H. Ratto, "In vitro developmental competence of alpaca (*Vicugna pacos*) and llama (*Lama glama*) oocytes after parthenogenetic activation," *Small Rumin. Res.*, vol. 133, pp. 148–152, 2015, doi: 10.1016/j.smallrumres.2015.08.014. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.08.014>