

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**Efecto de los activadores químicos post-ICSI  
sobre el desarrollo embrionario en  
*Vicugna pacos* “alpaca”.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO, EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. BELLIDO QUISPE, Dionet Keny**

**ASESOR:**

**Dr. MUJICA LENGUA, Fidel Rodolfo**

**CO-ASESOR:**

**M.V. CONTRERAS HUAMANÍ, Mijaíl**

**AYACUCHO - PERÚ**


**2023**


**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**  
**Bach. Dionet Keny BELLIDO QUISPE**  
**R.D. N° 014-2023-UNSCH-FCB-D**


En la ciudad de Ayacucho, siendo las cinco de la tarde del veintisiete de enero del año dos mil veintitrés; se reunieron los miembros del Jurado Evaluador en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, presidido por el Dr. Víctor Luis CÁRDENAS LÓPEZ (Presidente), Dr. Edwin PORTAL QUICAÑA (Miembro - Jurado), Dr. Jesús Javier ÑACCHA URBANO (Miembro - Jurado), Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA (Miembro - Asesor), actuando como secretario docente el Mg. Percy COLOS GALINDO, para presenciar la sustentación de tesis titulada: **“Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre el desarrollo embrionario en *Vicugna pacos* “alpaca”**; presentado por el Bach. **Dionet Keny BELLIDO QUISPE**; el Presidente luego de verificar la documentación presentada, indicó al secretario docente dar lectura a la documentación generada que refrenda el presente acto académico, luego de ello dispuso el inicio al acto de sustentación, indicando al sustentante que dispone de cuarenta y cinco minutos para exponer su trabajo de investigación tal como establece el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela Profesional de Biología. Culminada la exposición, el presidente invitó a cada uno de los Miembros Jurado a participar con sus observaciones, sugerencias y preguntas al sustentante. Culminado esta etapa, el presidente invitó al sustentante y al público asistente a abandonar momentáneamente el Auditorio para que los miembros del jurado evaluador puedan realizar las deliberaciones y calificaciones; cuyos resultados son los que se consignan a continuación.


MIEMBROS DEL JURADO EVALUADOR	EXPOSICIÓN	RESPUESTA A PREGUNTAS	PROMEDIO
Dr. Edwin PORTAL QUICAÑA	17	17	17
Dr. Jesús Javier ÑACCHA URBANO	17	16	17
		<b>PROMEDIO</b>	<b>17</b>

El sustentante alcanzó el promedio de 17 aprobatorio. Acto seguido, el presidente autorizó el ingreso del sustentante y el público al Auditorio dando a conocer los resultados, e indicando que de este modo se da por finalizado el presente acto académico, siendo las seis y cuarenta de la tarde; firmando al pie del presente en señal de conformidad.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Víctor Luis CÁRDENAS LÓPEZ  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Edwin PORTAL QUICAÑA  
Miembro - Jurado

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Jesús Javier ÑACCHA URBANO  
Miembro - Jurado

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA  
Miembro - Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Mg. Percy COLOS GALINDO  
Secretario - Docente



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA


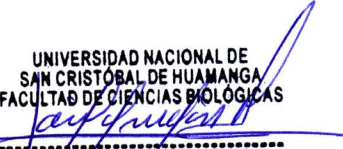
DECANATURA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS N° 05-  
2023-FCB-D

Yo, SAÚL ALONSO CHUCHÓN MARTÍNEZ, Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional De San Cristóbal De Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: "**I Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre el desarrollo embrionario en *Vicugna pacos* "alpaca"** presentado por el Bach. DIONET KENY BELLIDO QUISPE; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 17%, grado de coincidencia, menor a lo que determina la ausencia de plagio definido por el Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la UNSCH, aprobado con Resolución del Consejo Universitario N° 039-2021-UNSCH-C.

En tal sentido, la tesis cumple con las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se acompaña el INFORME FINAL DE TURNITIN correspondiente.

Ayacucho, 14 de febrero de 2023.

  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
  
-----  
Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez  
DECANO

# Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre el desarrollo embrionario en Vicugna pacos “alpaca”

*por* Dionet Keny Bellido Quispe

---

**Fecha de entrega:** 14-feb-2023 06:09a.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 2013946713

**Nombre del archivo:** LLIDO-\_QUISPE-\_Dionet-\_Keny-\_pregrado\_Tesis\_-\_2023\_TURNITIN.docx (5.02M)

**Total de palabras:** 17641

**Total de caracteres:** 90378

# Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre el desarrollo embrionario en Vicugna pacos "alpaca"

## INFORME DE ORIGINALIDAD

17%

INDICE DE SIMILITUD

17%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

0%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://repositorio.unsch.edu.pe">repositorio.unsch.edu.pe</a> Fuente de Internet	5%
2	<a href="http://www.tdx.cat">www.tdx.cat</a> Fuente de Internet	3%
3	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	2%
4	<a href="http://repositorio.unap.edu.pe">repositorio.unap.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="http://repositorio.unjbg.edu.pe">repositorio.unjbg.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
6	<a href="http://repositorio.uade.edu.ar">repositorio.uade.edu.ar</a> Fuente de Internet	1%
7	<a href="http://repositorio.unh.edu.pe">repositorio.unh.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1%
8	<a href="http://azm.ojs.inecol.mx">azm.ojs.inecol.mx</a> Fuente de Internet	<1%
9	<a href="http://idoc.pub">idoc.pub</a> Fuente de Internet	<1%

---

10	<a href="http://repositorio.lamolina.edu.pe">repositorio.lamolina.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
11	<a href="http://erecursos.uacj.mx">erecursos.uacj.mx</a> Fuente de Internet	<1 %
12	<a href="http://spermova.pe">spermova.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
13	<a href="http://zaguan.unizar.es">zaguan.unizar.es</a> Fuente de Internet	<1 %
14	<a href="http://sedici.unlp.edu.ar">sedici.unlp.edu.ar</a> Fuente de Internet	<1 %
15	<a href="http://ijas.ir">ijas.ir</a> Fuente de Internet	<1 %
16	<a href="http://link.springer.com">link.springer.com</a> Fuente de Internet	<1 %
17	<a href="http://bibliotecadigital.fvet.edu.uy">bibliotecadigital.fvet.edu.uy</a> Fuente de Internet	<1 %
18	<a href="http://ri.agro.uba.ar">ri.agro.uba.ar</a> Fuente de Internet	<1 %
19	<a href="http://www.scielo.org.mx">www.scielo.org.mx</a> Fuente de Internet	<1 %
20	Palomo Peiró, María Jesús. "Efecto del tratamiento de los espermatozoides sobre la	<1 %

---

# fecundación in vitro en el caprino", Bellaterra : Universitat Autònoma de Barcelona,, 2009

Fuente de Internet

---

21

[cybertesis.unmsm.edu.pe](http://cybertesis.unmsm.edu.pe)

Fuente de Internet

<1 %

---

22

[repositorio.unal.edu.co](http://repositorio.unal.edu.co)

Fuente de Internet

<1 %

---

23

[repositorio.espam.edu.ec](http://repositorio.espam.edu.ec)

Fuente de Internet

<1 %

---

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo

A Dios, por darme y guiarme en la vida;  
a mi madre y hermanos, por darme las  
fuerzas y motivos para luchar y salir  
adelante.



## AGRADECIMIENTOS

A mi *Alma Mater*, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, a la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Biología y la Especialidad de Biotecnología, por haberme permitido formarme profesionalmente.

Al Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán-INIA-Ayacucho, por todas las facilidades para el uso de los ambientes, equipos, materiales y reactivos.

Al Dr. FIDEL RODOLFO MUJICA LENGUA y al M.V. Mijaíl Contreras Huamaní; asesores del presente trabajo de investigación, por su amistad, comprensión, sugerencias y orientaciones, por haber depositado toda su confianza y por todo el apoyo brindado para culminar mi tesis. Mi especial gratitud al Dr. Fidel Mujica por el apoyo en la compra de los activadores químicos y el préstamo del sistema de micromanipulación del Laboratorio de Biotecnología de la UNSCH.

Al Blgo. Jenin Víctor Cortez Polanco (Australia), Dr. Luis Águila Paredes (Chile) y al Blgo. Zezé Humberto Bravo Gutiérrez (UNMSM), por compartirme sus conocimientos y ayudarme a superar las dificultades en el manejo del sistema de micromanipulación.

Al Blgo. Reynán Cóndor Alarcón, por el apoyo en la evaluación estadística.

A mis padres; por sus consejos, su amor, apoyo económico, por enseñarme a salir adelante, por confiar y creer en mis decisiones. En especial quiero agradecer a mi madre por estar siempre a mi lado, por escucharme y saber qué decirme, por estar siempre pendiente de mí, en las horas largas de estudio.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Proceso de fecundación de ovocitos	6
2.3. Activación de ovocitos	7
2.3.1. Mecanismo de la activación de ovocitos	7
2.3.2. Regulación del ciclo de calcio en la activación	9
2.3.3. Reservorios del calcio	11
2.4. Activación artificial de ovocitos	12
2.4.1. Agentes inductores de transición única de $Ca^{2+}$	13
2.4.2. Agentes que inducen oscilaciones dinámicas de $Ca^{2+}$	14
2.4.3. Agentes independientes de $Ca^{2+}$	15
2.5. Producción <i>in vitro</i> de embriones	17
2.5.1. Maduración <i>in vitro</i>	18
2.5.2. Fecundación <i>in vitro</i>	21
2.5.3. Cultivo <i>in vitro</i>	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Ubicación de la zona de estudio	27
3.2. Colecta de muestras	27
3.3. Población y muestra	27
3.4. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos	27
3.4.1. Colecta de ovarios	27
3.4.2. Recuperación y clasificación de los ovocitos	28
3.4.3. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos	28
3.5. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides	29
3.5.1. Recuperación, selección y capacitación de los espermatozoides	29

3.5.2. Denudación y selección de ovocitos maduros	29
3.5.3. Microinyección	30
3.5.4. Activación química de ovocitos post-ICSI	31
3.6. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones	32
3.7. Diseño estadístico	32
IV. RESULTADOS	35
V. DISCUSIÓN	53
VI. CONCLUSIONES	63
VII. RECOMENDACIONES	65
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	81

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Clasificación de los complejos ovocito- <i>cumulus</i> .	20
Tabla 2. Recuperación de los COCs de alpaca según la calidad ovocitaria y tasas de maduración de los ovocitos provenientes del Matadero Municipal de Huancavelica. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.	37
Tabla 3. Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre el porcentaje (media $\pm$ EEM) del desarrollo de embriones <i>in vitro</i> de alpaca a las 120 horas (5 días) de cultivo. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.	39
Tabla 4. Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre el porcentaje (media $\pm$ EEM) de la calidad de los embriones (mórula y blastocisto) de alpaca a las 120 horas (5 días) de cultivo. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Activación del ovocito desencadenada por el factor específico transmitido por los espermatozoides (Cardona et al., 2020).	9
Figura 2. Mecanismos de los ovocitos implicados en la regulación de $Ca^{2+}$ durante la activación de los ovocitos (Yeste et al., 2016).	12
Figura 3. Métodos de activación química en ovocitos.	17
Figura 4. Media porcentual de la calidad y tasas de maduración de los ovocitos provenientes del Matadero Municipal de Huancavelica. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.	38
Figura 5. Desarrollo <i>in vitro</i> de embriones de alpaca con activación química post-ICSI a las 120 horas (5 días) de cultivo. Letras diferentes en las barras indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p<0,05$ ). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.	40
Figura 6. Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre el clivaje a las 48 h de cultivo. Letras diferentes en la parte superior de las cajas indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p<0,05$ ). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.	41
Figura 7. Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre el estadio de mórula a las 120 horas (5 días) de cultivo. Letras diferentes en la parte superior de las cajas indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p<0,05$ ). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.	42
Figura 8. Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre el estadio de blastocisto a las 120 horas (5 días) de cultivo. Letras diferentes en la parte superior de las cajas indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p<0,05$ ). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.	43
Figura 9. Embriones ICSI de alpaca, después de 5 días (120 h) de cultivo <i>in vitro</i> . (A) ovocito maduro (MII); (B) cigoto; (C) embrión de 2 blastómeros; (D) embrión de 4 blastómeros; (E) embrión en	

- estadio de mórula temprana; (F) embrión en estadio de mórula compacta; (G-H) embriones en estadio de blastocisto. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho. 44
- Figura 10. Calidad de los embriones (mórula y blastocisto) de alpaca con activación química post-ICSI a las 120 horas (5 días) de cultivo. Letras diferentes en las barras indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho. 46
- Figura 11. Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre la calidad excelente a las 120 horas (5 días) de cultivo. Letras diferentes en la parte superior de las cajas indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho. 47
- Figura 12. Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre la calidad buena a las 120 horas (5 días) de cultivo. Letras diferentes en la parte superior de las cajas indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho. 48
- Figura 13. Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre la calidad regular a las 120 horas (5 días) de cultivo. Letras diferentes en la parte superior de las cajas indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho. 49
- Figura 14. Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre la calidad mala a las 120 horas (5 días) de cultivo. Letras diferentes en la parte superior de las cajas indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho. 50
- Figura 15. Calidad de los embriones de alpaca, después de 5 días (120 h) de cultivo *in vitro*. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho. (A-B) excelente; (C-E) bueno; (F-H) regular; (I-K) malo. MT: mórula temprana; MC: mórula compacta; BT: blastocisto temprano; BE: blastocisto expandido. 51

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo 1. Soluciones stock para la preparación de los medios de cultivo utilizados en la producción <i>in vitro</i> de embriones de alpaca.	83
Anexo 2. Soluciones stock para la preparación de los medios de activación de ovocitos post-ICSI.	84
Anexo 3. Composición de la solución salina fisiológica con gentamicina.	84
Anexo 4. Composición del medio de manipulación.	84
Anexo 5. Composición del medio de maduración.	85
Anexo 6. Composición del medio Tyrode's Albúmina Lactato Pyruvato (TALP).	85
Anexo 7. Composición del medio de mantenimiento de ovocitos post-ICSI.	86
Anexo 8. Composición del medio de activación con etanol.	86
Anexo 9. Composición del medio de activación con ionomicina.	86
Anexo 10. Composición del medio de activación con 6-DMAP.	86
Anexo 11. Composición del medio de activación con SrCl <sub>2</sub> .	87
Anexo 12. Composición del medio de cultivo SOFaa.	87
Anexo 13. Flujograma de recuperación de espermatozoides de alpaca a partir de epidídimos de testículos procedentes del matadero.	88
Anexo 14. Flujograma de maduración <i>in vitro</i> de ovocitos de alpaca.	89
Anexo 15. Selección y capacitación de los espermatozoides.	90
Anexo 16. Flujograma de denudación de ovocitos y preparación de los ovocitos para la fecundación por ICSI.	91
Anexo 17. Flujograma de fecundación <i>in vitro</i> por inyección intracitoplasmática de espermatozoides (FIV- ICSI) de ovocitos de alpaca.	92
Anexo 18. Flujograma de activación de ovocitos post-ICSI.	93
Anexo 19. Flujograma de cultivo <i>in vitro</i> de ovocitos ICSI.	94
Anexo 20. Calidad de los ovocitos de alpaca según morfología. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.	95
Anexo 21. Prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (Bartlett) en el clivaje, estadios y calidad embrionaria, $p < 0,05$ .	96

Anexo 22. Análisis de varianza de las medias porcentuales del desarrollo (Clivaje, mórula y blastocisto) y calidad embrionaria (bueno y regular) en alpacas, $p < 0,05$ .	96
Anexo 23. Comparación múltiple de Duncan para el clivaje en alpaca con un nivel de significancia de 95 %, ( $p < 0,05$ ).	96
Anexo 24. Comparación múltiple de Duncan en el estadio de mórula con un nivel de significancia de 95 %, ( $p < 0,05$ ).	97
Anexo 25. Prueba de kruskal wallis para la calidad embrionaria (excelente) con un nivel de confianza de 95 %, ( $p < 0,05$ ).	97
Anexo 26. Comparación múltiple de Duncan para la calidad embrionaria (buena), con un nivel de confianza de 95 %, ( $p < 0,05$ ).	97
Anexo 27. Prueba de kruskal wallis para la calidad embrionaria (malo), con un nivel de confianza de 95 %, ( $p < 0,05$ ).	98
Anexo 28. Prueba de rangos para la calidad embrionaria (malo), con un nivel de confianza de 95 %, ( $p < 0,05$ ).	98
Anexo 29. Matriz de consistencia.	99



## RESUMEN

La eficacia de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), en la producción *in vitro* de embriones de alpaca es baja en comparación a la fecundación *in vitro* (FIV), debido a que depende, entre otros factores, de un paso adicional clave, referido a la inadecuada activación del ovocito post-ICSI. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre las tasas en el estadio y calidad embrionaria del desarrollo embrionario en *Vicugna pacos* "alpaca". La investigación fue ejecutada en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán (INIA-Ayacucho, Perú). Se colectaron ovarios de matadero, los cuales fueron transportados a 4-9 °C en SSF con 80 µg/ml de gentamicina. Los complejos ovocito-cumulus (COCs) fueron recuperados de folículos de 2 a 7 mm de diámetro y se maduraron solo los ovocitos de categorías I, II y III durante 30 h a 38,5 °C. La ICSI se realizó mediante un procedimiento estándar y los ovocitos inyectados se distribuyeron al azar y se activaron con tratamientos únicos o combinados como sigue: i) 5 µM de ionomicina durante 5 min (Io), ii) 7 % de etanol durante 4 min (EtOH) iii), 5 µM de ionomicina durante 5 min, periodo ventana 3 h más 7 % de etanol durante 4 min (Io/EtOH), iv) 5 µM de ionomicina durante 5 min, periodo ventana de 3 h, un segundo tratamiento con ionomicina durante 5 min, seguida de 1.9 mM de 6-DMAP durante 3 h (2Io/6-DMAP), v) 10 mM de SrCl<sub>2</sub> durante 3 h. El cultivo fue realizado en el medio fluido oviductal sintético (SOFaa) a 38,5 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 90% de N<sub>2</sub> en aire durante 48 h y 5 días (clivaje y desarrollo embrionario, respectivamente). Los datos fueron sometidos a la prueba de Shapiro-Wilk y Bartlett con el programa estadístico R 3.4.3. Para determinar las diferencias entre tratamientos se utilizó ANOVA con la prueba de Duncan y la prueba de Kruskal-Wallis. Para todos los análisis, se consideró significativa (p<0,05). El porcentaje en clivaje 90,0; 86,7; 80,4 y 58,8 % y mórulas 50,8; 59,2; 59,2 y 43,3 %, fueron superiores en los tratamientos con Io/EtOH, EtOH, Io y 2Io/6-DMAP, respectivamente, en comparación con el SrCl<sub>2</sub> 35,0 y 15,0 % y control (sin activación) 55,0 y 37,5 %, respectivamente. El porcentaje de embriones de calidad buena 46,7; 54,2 y 44,6 % fueron superiores en los tratamientos con Io, EtOH y Io/EtOH, respectivamente, en comparación con 2Io/6-DMAP, SrCl<sub>2</sub> y control, que resultaron 11,3; 15,0 y 22,5 %, respectivamente. No hubo diferencias entre grupos para blastocistos o embriones de calidad excelente, regular o mala. En conclusión, los resultados del presente estudio muestran que la activación de ovocitos de alpaca post-ICSI es más eficiente con los activadores de aumentos únicos de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, como EtOH, Io y Io/EtOH, en comparación con 2Io/6-DMAP y SrCl<sub>2</sub>.

**Palabras clave:** producción *in vitro* (PIV) de embriones, activación de ovocitos, inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), desarrollo embrionario, *Vicugna pacos* "alpaca".

## I. INTRODUCCIÓN

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) implica la fertilización de un ovocito maduro en metafase II, mediante la inyección directa de un solo espermatozoide en su ooplasma. Esta técnica podría ser útil para producir embriones a partir de espermatozoides eyaculados de machos con oligoastenoteratozoospermia, con espermatozoides provenientes del epidídimo por alteraciones en la eyaculación como la obstrucción de los conductos excretores seminales o de animales muertos, así como células inmaduras de los espermatozoides como la inyección de espermátida redonda (ROSI) y la inyección de espermátida alargada (ELSI).

Durante la fertilización normal, la entrada del espermatozoide en el ovocito desencadena una serie de oscilaciones de calcio intracelular, que son responsables de la activación del ovocito, sin embargo, este proceso no se desarrolla en el procedimiento ICSI. En varias especies como el humano (Tesarik et al., 1994; Catt & Rhodes, 1995), el conejo (Keefer, 1989), el hámster (Uehara & Yanagimachi, 1976) y el ratón (Kimura & Yanagimachi, 1995), el procedimiento de inyección en sí aparentemente es suficiente para activar a los ovocitos, lo que lleva a la descondensación de los espermatozoides y la formación de los pronúcleos. Sin embargo, en otras especies, como la alpaca, se requiere de una estimulación exógena.

La activación de ovocitos con estímulos adicionales durante el procedimiento de ICSI aumenta el calcio libre en el ooplasma que causa la destrucción del factor citostático y la degradación del factor promotor de la maduración (MPF), esencialmente para reiniciar la segunda división de meiosis y la formación de los pronúcleos masculino y femenino (Suttner et al., 2000; Oikawa et al., 2005). La activación de los ovocitos puede ser inducida por una variedad de agentes químicos, pulsos eléctricos e incluso la manipulación de los ovocitos (físico).

Se han producido embriones *in vitro* por la ICSI en dromedarios, llamas y alpacas (Miragaya et al., 2003; Sansinena et al., 2007; Conde et al., 2008; El-Sayed et al., 2015; Wani & Hong, 2018; Castro-Modesto et al., 2022), lo que indica que este sistema tiene éxitos para los camélidos del viejo mundo y camélidos del nuevo mundo, sin embargo, aún falta optimizar los procedimientos en cuanto a uso del mejor activador químico para gatillar los eventos de la activación de ovocitos ICSI.

A la fecha, no existen reportes de la producción *in vitro* de embriones de alpaca post-ICSI, sometidos a diversos activadores químicos, y evaluación de la calidad embrionaria, por lo que el presente estudio tuvo como objetivos:

**Objetivo general**

Evaluar el efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre el desarrollo embrionario en *Vicugna pacos* “alpaca”.

**Objetivos específicos**

1. Determinar el mejor activador para lograr la mayor tasa en el estadio de desarrollo en ovocitos post-ICSI en *Vicugna pacos* “alpaca”.
2. Determinar el mejor activador en la calidad de los embriones expuestos a los activadores químicos post-ICSI en *Vicugna pacos* “alpaca”.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

En el año 2022, se reportó por primera vez la producción *in vitro* de embriones de alpaca por ICSI. En dicha investigación, se examinó la maduración potencial de ovocitos provenientes de folículos pequeños y grandes, así como la inyección después de la maduración *in vitro* (MIV). En el primer experimento, se maduraron los COCs de categoría I y II provenientes de folículos grandes (2-8 mm) y folículos pequeños (<2 mm) durante 32 a 36 h. En el segundo experimento, se realizó la inyección en Global Total con HEPES (LGTH) y se utilizó 10% PVP para inmovilizar los espermatozoides después de la selección por *Swim up*; luego de la inyección, los ovocitos fueron activados con ionomicina y 6-DMAP y seguidamente fueron cultivados por 7 días. Los resultados mostraron que el rendimiento de COCs clasificados morfológicamente de buena calidad fue significativamente mayor en los folículos grandes ( $2,1 \pm 0,8$ ) que en los pequeños ( $1,2 \pm 0,7$ ). Sin embargo, tras la maduración no se observaron diferencias significativas en la tasa de metafase II (18,1% vs 22,1%) y ovocitos degenerados (48% vs 57%). En el siguiente experimento, se inyectaron 27 ovocitos dando 31,3 % de clivaje y 12,5 % de mórula para aquellos ovocitos activados químicamente (Castro-Modesto et al., 2022).

En dromedarios, en una investigación se evaluó el desarrollo de los ovocitos madurados *in vitro* después de la ICSI con espermatozoides de epidídimo. Los COCs se maduraron en 500  $\mu$ l de medio de maduración por 30 h. El día de la inyección, los espermatozoides se seleccionaron y capacitaron por *Swim up*. Los ovocitos inyectados fueron activados con ionomicina y roscovitina o se pusieron en cultivo sin ninguna activación. En el Experimento 1, los presuntos cigotos se fijaron y tiñeron con Hoechst 33342 para evaluar la fertilización después de 18 h de cultivo, mientras que, en el Experimento 2, se cultivaron en 500  $\mu$ l del medio

de cultivo durante 7 días para evaluar su desarrollo. La proporción de ovocitos activados cuando la ICSI fue seguida de activación química fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) en comparación con los no activados. En el experimento 2, se escindió un mayor número de ovocitos (59 vs. 35%) y se desarrollaron a blastocistos (20 vs. 7%) en el grupo con activación post-ICSI en comparación con el grupo sin activación química, respectivamente (Wani & Hong, 2018).

En bovinos, se ha investigado la eficacia de varias combinaciones de activadores de ovocitos bovinos tras la ICSI en términos de escisión y desarrollo embrionario. Los ovocitos bovinos de ICSI fueron sometidos a varios tratamientos con activadores combinados o únicos, como sigue: 30 V para 15 x 2  $\mu$ seg de pulso eléctrico + 10  $\mu$ g / ml de cicloheximida (CHX), etanol al 7% + CHX, Ionóforo de calcio 5  $\mu$ M A23187 (Ca-I) + CHX, Ca-I + 6-dimetilaminopurina 1,9 mM (6-DMAP), solo CHX, solo Ca-I. La mayor escisión (73,5% -79,7%) y las tasas de blastocistos (28,0% -35,3%) se obtuvieron en los grupos Ca-I + 6-DMAP, etanol + CHX y estímulos eléctricos + CHX. El tratamiento con solo CHX o Ca-I dio un rendimiento significativamente menor ( $P < 0.05$ ) de tasa de escisión y blastocisto que aquellos tratamientos con Ca-I + 6-DMAP, etanol + CHX, estimulación eléctrica y Ca-I + CHX (Tasripoo et al., 2012).

Por otro lado, en otro estudio se evaluó el efecto de 4 tratamientos de activación química, 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), cicloheximida (CHX), anisomicina (ANY) y etanol (EtOH) sobre la formación pronuclear y el desarrollo embrionario de embriones bovinos generados por ICSI. La ICSI se realizó mediante un procedimiento estándar. Los ovocitos inyectados se distribuyeron al azar y se activaron con 5  $\mu$ M de ionomicina durante 5 minutos (Io), seguidos de i) 5  $\mu$ g/ml de CHX durante 5 h (Io/CHX), ii) periodo ventana de 3 h seguida de un segundo tratamiento con Io más 1,9 mM de 6-DMAP durante 4 h (2Io/6-DMAP), iii) 1  $\mu$ g/ml de ANY durante 5 h (Io/ANY), y iv) periodo ventana de 3 h seguida de etanol al 7% (Io/EtoH). Los embriones se cultivaron en medio KSOM y la escisión se registró a las 72 h y la tasa de blastocistos a las 192 h. Los resultados mostraron diferencias en la escisión ( $P < 0,01$ ) en los tratamientos 6-DMAP, CHX y ANY (86, 72 y 78%, respectivamente), en relación con el EtOH (12%). Del mismo modo, las tasas de blastocistos fue mayor con 6-DMAP, CHX y ANY (41, 20 y 32%, respectivamente), en relación con 4% EtOH (Arias et al., 2015).

En otro estudio en bovinos, se investigó los efectos de la calidad de los ovocitos y los protocolos de activación sobre la competencia de desarrollo *in vitro* de embriones bovinos después de la ICSI. Los ovocitos bovinos se agruparon en calidad excelente, buena y mala. Todos los ovocitos se activaron usando solo un ionóforo de calcio, solo etanol y 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) después del ionóforo de calcio. Para los ovocitos de excelente calidad, las tasas de escisión después de ICSI fueron del 70% en el grupo de activación de ionóforo de Ca + 6-DMAP, 47% en el grupo de activación de etanol, 41,82% en el grupo de ionóforo de Ca y 30% en el grupo control. Las tasas de escisión de los ovocitos de buena calidad después de la activación con estos diferentes agentes fueron 31%, 16,03%, 19,8% y 12,9%, respectivamente, mientras que las tasas de los ovocitos de mala calidad fueron menores 7%, 6%, 2% y 1%, respectivamente (Korkmaz et al., 2013).

En otra investigación en bovino, se evaluó la eficacia de la técnica ICSI con un paso adicional de activación de ovocitos antes o después del procedimiento ICSI. Se utilizó ionóforo de calcio A23187 para activar los ovocitos y determinar su efecto sobre el desarrollo en ovocitos antes y después de la ICSI. Los resultados en el tratamiento de activación con A23187 antes o después de la ICSI fue más eficaz que una combinación de ambos tratamientos (Habsah et al., 2016).

Otro estudio en bovino, se investigó la inyección subzonal de esperma (SUZI) para conocer los patrones de penetración de los espermatozoides y utilizar la ICSI para mejorar la producción de embriones bovinos utilizando gametos de baja calidad. Los ovocitos de baja calidad fueron sometidos a SUZI con esperma de dos toros, A y B, con mal y buen vigor espermático, luego, los ovocitos de mala y buena calidad se sometieron al ICSI seguido de una activación química con ionomicina y 6-DMAP. Las tasas de penetración de los ovocitos fueron menores para el toro A que para el toro B (29,6% vs. 53,8%,  $P < 0,05$ ), dentro de las primeras horas y disminuye cuando la SUZI se realizó después de 3 horas del procesamiento del esperma siendo más marcada para el toro B. Mientras que, en la ICSI, independientemente del toro o del grado de calidad de los ovocitos, no hubo diferencias en las tasas de clivaje o de blastocistos (Ohlweiler et al., 2013).

En caprinos, se investigó el efecto de la activación del ionóforo de calcio en la producción de blastocistos tras la ICSI en ovocitos madurados *in vitro*. Se

seleccionaron un total de 470 ovocitos madurados *in vitro* y se dividieron aleatoriamente en tres grupos. En el grupo 1, (n = 168) se inyectaron ovocitos maduros con micropipeta de inyección sin esperma como control. En el grupo 2, (n = 152) se inyectaron espermatozoides capacitados en el citoplasma del ovocito. En el grupo 3, (n = 150) se inyectaron espermatozoides capacitados en el citoplasma del ovocito y luego se activaron con 5  $\mu$ M de ionóforo de calcio durante 5 minutos. Luego, los ovocitos de todos los grupos se cultivaron en medio RVCL para el desarrollo del embrión. La tasa de escisión se observó después de 48-72 h de la inyección. La tasa de escisión y la producción de blastocistos en los grupos 1, 2 y 3 fueron de 0,00 y 0,00; 18,42 y 3,57; y 61,33% y 16,30%; respectivamente (Kharche et al., 2016).

## **2.2. Proceso de fecundación de ovocitos**

En los mamíferos, la fecundación se define como el proceso en el que un espermatozoide capacitado atraviesa el *cumulus oophorus* y la zona pelúcida (ZP), se fusiona con la membrana del ovocito y lo activa para dar lugar a una serie de eventos que posteriormente darán inicio a la embriogénesis, dicho proceso ocurre generalmente en la *ampulla* del oviducto (Yeste, 2013a). Por otro lado, para que un espermatozoide interactúe con el ovocito, debe haber sido capacitado previamente. La capacitación de los espermatozoides consiste en una amplia gama de cambios que ocurren después de la eyaculación, cuando los espermatozoides entran en contacto con los fluidos del tracto genital femenino, los que incluyen la afluencia de  $Ca^{2+}$ , la fosforilación de las proteínas espermáticas, cambios en los patrones de motilidad de los espermatozoides y un aumento en el desorden de los lípidos de la membrana plasmática (Aitken & Nixon, 2013).

Los espermatozoides capacitados deberán atravesar las diferentes envolturas que rodean al ovocito (*cumulus oophorus* y ZP) para contactarse y fusionarse con la membrana plasmática del mismo. El proceso involucra interacciones célula-matriz (espermatozoide-*cumulus oophorus* y espermatozoide-ZP) y célula-célula (membranas plasmáticas del espermatozoide y el oolema del ovocito), mediadas por moléculas presentes en ambos gametos, y culmina con la fusión de las membranas que desencadena la activación del ovocito (Gómez, 2019). Como consecuencia de ello da comienzo la exocitosis de los gránulos corticales, reanudación del ciclo celular meiótico, extrusión del segundo corpúsculo polar (CP), reordenamiento del citoesqueleto, reclutamiento del ARNm materno (traducción de los ARNm maternos), descondensación de la cabeza

espermática, formación de pronúcleo (PN) masculino y femenino, singamia de los PN, transición de la meiosis a la mitosis y la activación del genoma del cigoto para dar lugar al desarrollo embrionario (Swann et al., 2004; Ajduk et al., 2006; Swann & Yu, 2004; Swann & Lai, 2016).

### **2.3. Activación de ovocitos**

#### **2.3.1. Mecanismo de la activación de ovocitos**

Tras la fusión de las membranas del espermatozoide y del ovocito, todo el espermatozoide, excepto la membrana plasmática, es engullido por el citoplasma del ovocito (Yanagimachi, 1998). Seguidamente, se produce un proceso conocido como activación del ovocito que permite al ovocito, secuestrado en metafase II de meiosis, completar la segunda división meiótica (Jones, 2007; Horner & Wolfner, 2008; Dale et al., 2010). En circunstancias normales, la presencia de un espermatozoide en el citoplasma del ovocito provoca una serie de aumentos repetidos de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), los que se conocen como oscilaciones de calcio (Swann, 1990; Kline & Kline, 1992), que provocan una serie de eventos clave, conduciendo a una serie de cambios morfológicos y bioquímicos, constituyendo los primeros pasos del desarrollo embrionario. La activación del ovocito, comprende eventos tempranos, como la exocitosis de los gránulos corticales y la reanudación del ciclo celular meiótico; y eventos tardíos, como la extrusión del segundo CP, los reordenamientos del citoesqueleto, el reclutamiento del ARNm materno (traducción de los ARNm maternos), la descondensación de la cabeza espermática, la formación de los PN y la transición de la meiosis a la mitosis (Swann et al., 2004; Ajduk et al., 2006; Swann & Yu, 2004; Swann & Lai, 2016). Estas oscilaciones periódicas de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  producen una ventana temporal específica, y son críticas tanto para la activación del ovocito como para el inicio de la embriogénesis (Amdani et al., 2016).

Actualmente se acepta en mamíferos, a la proteína citosólica específica de los espermatozoides, conocida como la fosfolipasa c zeta (PLC $\zeta$ ), como una candidata del factor activador de ovocitos transmitido por espermatozoides (SOAF), del inglés: *sperm-borne oocyte activating factor*, y que activa a los ovocitos tras la fusión entre el espermatozoide y el ovocito (Saunders et al., 2002; Kashir et al., 2010; Amdani et al., 2016).

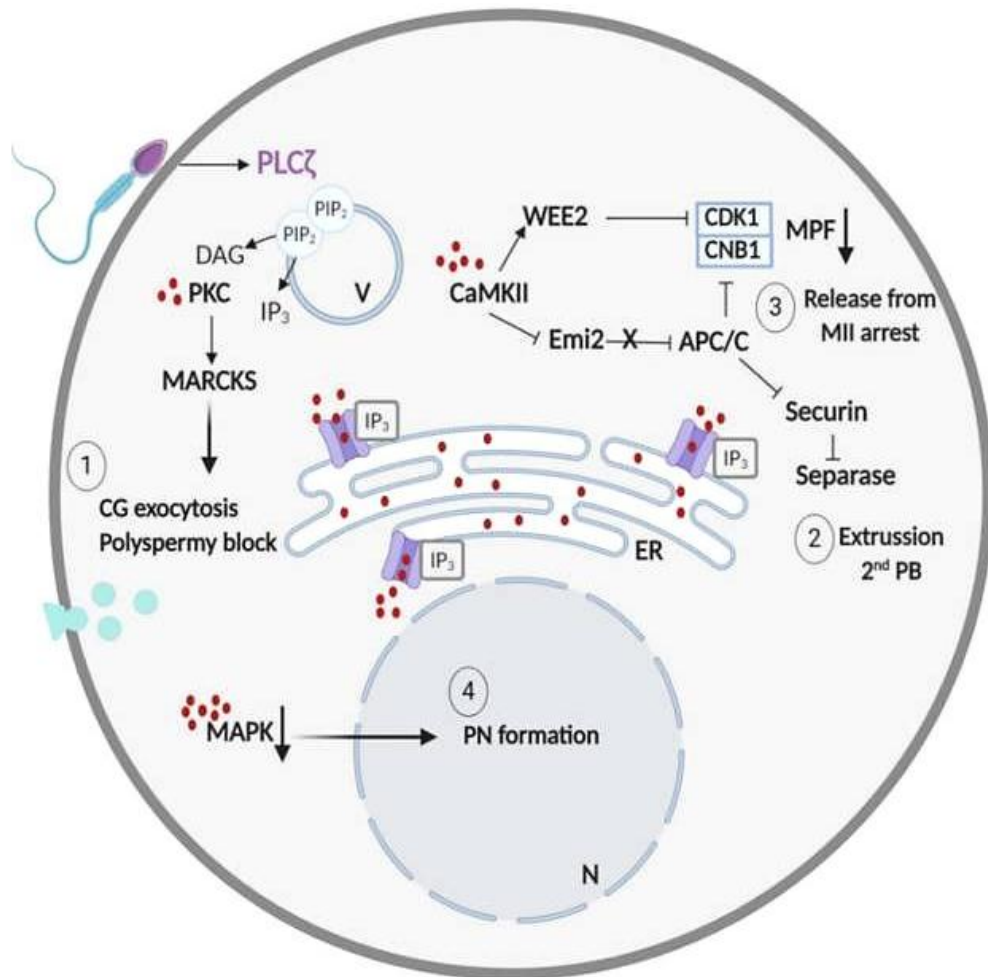
Como se mencionó, la fusión desencadena la activación del ovocito, esto se debe a que el espermatozoide no sólo introduce su material genético en el



ooplasma del ovocito, sino también a la proteína PLC $\zeta$  (Yeste et al., 2016; Kashir et al., 2010; Nomikos et al., 2017). Una vez introducida la PLC $\zeta$ , esta se dirige a las vesículas citoplasmáticas que contienen fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP $_2$ ) y promueve la producción de dos nuevas moléculas el inositol 1,4,5-trifosfato (IP $_3$ ) y el diacilglicerol (DAG). Luego, las moléculas de IP $_3$  se unirán a su receptor (IP $_3$ R) presente en el retículo endoplásmico (RE), lo que conducirá a la liberación del Ca $^{2+}$  de las reservas del RE (Yu et al., 2012).

La generación de oscilaciones intermitentes de Ca $^{2+}$  de larga duración se produce debido a una regulación dual de IP $_3$ R. La disminución de la [Ca $^{2+}$ ] $_i$  aumenta la sensibilidad de IP $_3$ R, lo que da como resultado la liberación de Ca $^{2+}$  del RE; mientras que si la [Ca $^{2+}$ ] $_i$  es elevada, se inhiben los canales IP $_3$ R y se detiene el suministro de Ca $^{2+}$  al citoplasma (Williams, 2002; Stein et al., 2020). Las oscilaciones de Ca $^{2+}$  activan varias quinasas de los ovocitos que desencadenan diferentes eventos posteriores necesarios para la fertilización en un orden dependiente del tiempo (Ducibella et al., 2002). Primero, el DAG y el Ca $^{2+}$  libre en el citoplasma, promueve la activación de la proteína quinasa C (PKC), y este fosforila al sustrato de PKC ricos en alanina miristoilada (MARCKS), que son responsables de la inducción de la exocitosis de los gránulos corticales (CGs) y del bloqueo de la polispermia, ver Figura 1 (Tsaadon et al., 2008). En segundo lugar, el aumento de la [Ca $^{2+}$ ] $_i$  activará la proteína quinasa II dependiente de Ca $^{2+}$ /calmodulina (CaMKII), que a su vez fosforilará el inhibidor mitótico temprano 2 (Emi2). Entonces, Emi2 será degradado por un complejo de ubiquitina-ligasa y ya no podrá inhibir al complejo/ciclosoma promotor de la anafase (Dupont, 1998; Ducibella & Fissore, 2008). El complejo/ciclosoma promotor de la anafase (APC/C) activa promoverá la extrusión del segundo cuerpo polar mediante la degeneración de la securina y la posterior inhibición de la separasa (Jones, 2005) y la liberación del ovocito de la segunda división meiótica por la degradación del factor promotor de la maduración (Madgwick et al., 2005). El factor promotor de la maduración (MPF) es una proteína quinasa heterodímero serina-treonina, compuesta por una subunidad catalítica, quinasa dependiente de ciclina 1 (CDK1) también llamada p34<sup>cdc2</sup>, y una subunidad reguladora, ciclina B (CNB1). Específicamente, APC/C se dirige a la degeneración de CNB1. Sin embargo, se ha informado que para disminuir los niveles de MPF y permitir la reanudación del ciclo celular, tanto la degeneración de CNB1 por APC/C como la inhibición de CDK1 por la proteína

quinasa 2 similar a Wee1 (WEE2), que es otro ovocito quinasa, son necesarias (Sang et al., 2018; Oh et al., 2011). Finalmente, las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  inactivarán la ruta de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), que permitirá la formación de los PN (Ducibella & Fissore, 2008). Por lo tanto, las deficiencias en cualquiera de las proteínas de los espermatozoides u ovocitos involucradas en la activación del ovocito probablemente conducirán a fallas en la fertilización.



**Figura 1.** Activación del ovocito desencadenada por el factor específico transmitido por los espermatozoides (Cardona et al., 2020).

### 2.3.2. Regulación del ciclo de calcio en la activación

Tras la fusión, el  $\text{Ca}^{2+}$  se libera del RE a través del  $\text{IP}_3\text{R}$  hacia el citoplasma del ovocito, lo que da como resultado un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Posteriormente, las ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática (PMCA) y los intercambiadores de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exportan una gran parte de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmicos al medio extracelular. Como consecuencia, los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular volverán a los

niveles iniciales por la disminución de  $\text{Ca}^{2+}$  en el oolema del ovocito. Sin embargo, las reservas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en el RE son limitadas. Por lo tanto, se requiere la necesidad de que los iones  $\text{Ca}^{2+}$  migren desde el medio extracelular al citoplasma del ovocito para continuar las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  que se observan después de la fertilización. Esta importación de  $\text{Ca}^{2+}$  se logra mediante la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por SOCE del inglés, *store-operated calcium entry* (Berridge et al., 2000; Bootman et al., 2001) y las ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoendoplásmico (SERCA) que facilitan la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citoplasma del ovocito y el RE del ovocito, respectivamente (Wakai et al., 2013). En los mamíferos, los dos actores clave de la SOCE son la proteína del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  activado por liberación 1 (Orai1) y la molécula de interacción del estroma (STIM) 1 y 2 (Cahalan, 2009; Wang et al., 2012). Mientras que Orai1 es un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  asociado a la membrana plasmática, STIM 1 y 2 son sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  asociados a la membrana del RE. STIM 2 sólo se activa cuando hay una pequeña disminución de  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en el RE, mientras que STIM1 se activa cuando las reservas del RE se agotan drásticamente del ion  $\text{Ca}^{2+}$  (Brandman et al., 2007).

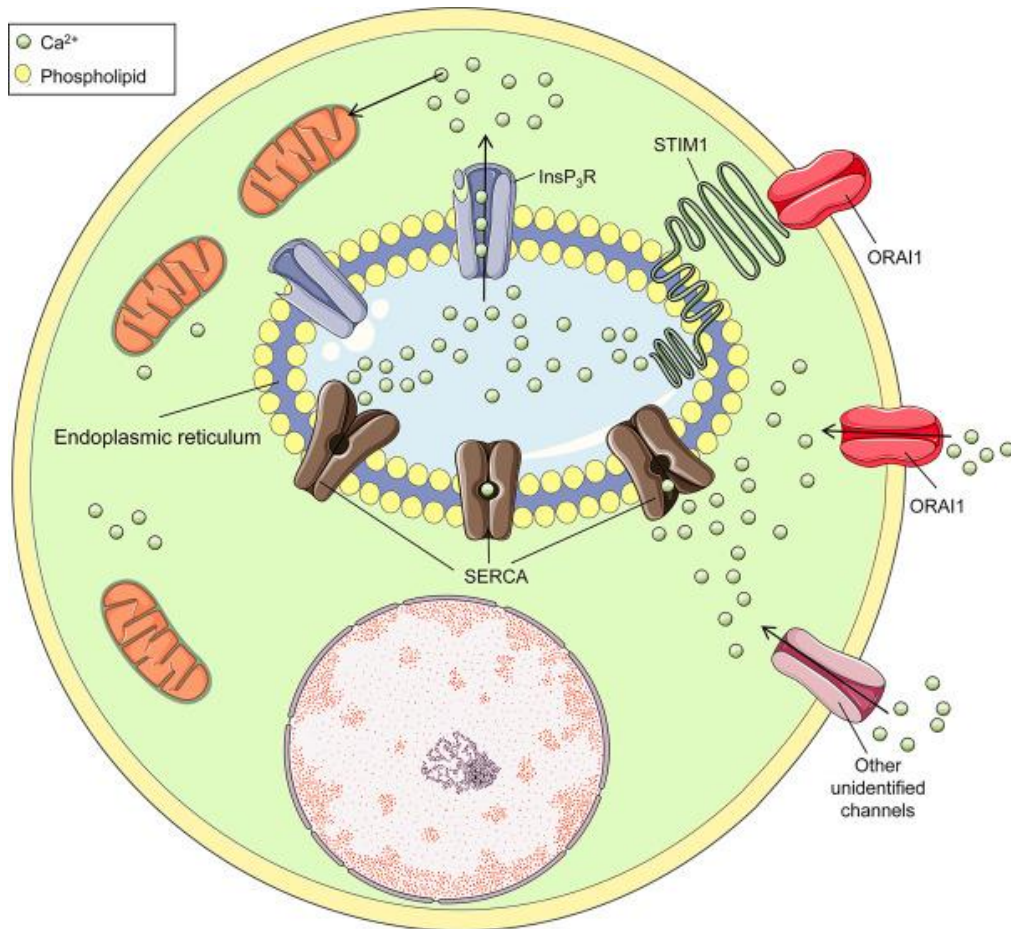
Cuando el STM1 detecta niveles bajos de  $\text{Ca}^{2+}$  en el lumen del RE, las STIM1s se agrupan y migran hacia la membrana plasmática del ovocito. Esto permite la interacción y la posterior apertura del canal Orai1, que a su vez da como resultado la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ovocito. Este  $\text{Ca}^{2+}$  es posteriormente bombeado de regreso al lumen del RE por las bombas de calcio SERCA. Este mecanismo de ciclo de  $\text{Ca}^{2+}$  asegura el período prolongado de aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$ , conforme a la Figura 2 (Brandman et al., 2007; Cahalan, 2009; Miao et al., 2012).

Aunque se ha demostrado que SOCE apoya la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la activación de ovocitos en experimentos con ratones y cerdos (Wang et al., 2012; Gomez-Fernandez et al., 2009; Lee et al., 2012; Wang et al., 2015), pero se cuestiona su importancia y necesidad. En el ratón, se ha demostrado que la interferencia del sistema STIM1/2-Orai todavía resultaba en oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Miao et al., 2012; Takahashi et al., 2013). Esto plantea la posibilidad de que los mecanismos de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  independientes de SOCE sean responsables de mantenerlos transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  de larga duración. Recientemente, la necesidad de STIM1 y STIM2 se consideró mediante la creación de ratones *knockout* condicional específicos de ovocitos (cKO) para ratones STIM1 y STIM2 y STIM1/2 doble-cKO. Los resultados mostraron que la ausencia de STIM1 y/o

STIM2 no afectó las reservas de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  después del agotamiento de las reservas o el patrón normal de oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se observaron resultados similares en ratones *knockout* (KO) de Orai1. Estos datos muestran que el mecanismo STIM-Orai es prescindible para soportar las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en los ovocitos de ratón tras la fertilización (Bernhardt et al., 2017). Los estudios con ratones determinaron la participación de diferentes canales de una manera independiente de SOCE. Estos principales canales del oolema que intervienen en el influjo de calcio extracelular para apoyar las reservas del RE y por ende las ocurrencias de oscilaciones son el canal de tipo T activado por voltaje Cav3.2, también responsable del influjo durante la maduración (Bernhardt et al., 2015). Además, se descubrió que el canal del potencial receptor transitorio de melastatina 7 (TRPM7) era un candidato prometedor para contribuir al influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Bernhardt et al., 2018). Estos resultados postulan que, por ejemplo, los ovocitos porcinos podrían depender más de SOCE que los ovocitos de ratón, lo que podría explicar las diferencias observadas entre especies. Por otra parte el canal TRPV3 presente en el ovocito también podría contribuir a las oscilaciones (Carvacho et al., 2013).

### **2.3.3. Reservorios del calcio**

Si bien el retículo endoplasmático es el principal reservorio de calcio en el ovocito (Gardiner & Grey, 1983), las mitocondrias también contribuirían a esta función, además de su rol en la fosforilación oxidativa (Dumollard et al., 2004). Por lo tanto, juegan un papel importante en los ovocitos durante la fertilización. Como se observa en la Figura 2, después de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{IP}_3$  desde el RE al citoplasma del ovocito, las mitocondrias captan  $\text{Ca}^{2+}$  a través del canal de captación 1 de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial o MICU1 (Perocchi et al., 2010). Dentro de la matriz mitocondrial, la presencia de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  estimula la producción de energía (ATP). A su vez, el ATP mitocondrial se libera fuera de las mitocondrias y es consumido por bombas SERCA para restaurar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE, que luego está listo para inducir un nuevo aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma del ovocito. Por lo tanto, las mitocondrias también son importantes depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  que contribuyen a la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y la inducción de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta (Duchen, 2000; Rizzuto et al., 2000). En este sentido, ovocitos con menor cantidad de mitocondrias o función mitocondrial alterada presentarían problemas de activación con fallas en el patrón de oscilaciones de calcio (Yeste et al., 2016).



**Figura 2.** Mecanismos de los ovocitos implicados en la regulación de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la activación de los ovocitos (Yeste et al., 2016).

#### 2.4. Activación artificial de ovocitos

La activación artificial de ovocitos (AOA) intenta inducir la activación utilizando las propiedades fisiológicas de los gametos. En general, intentan aliviar la concentración de calcio intracelular e imitan las oscilaciones. Como se sabe, existe una gran variabilidad específica de especies en los mecanismos de activación de los ovocitos, por lo tanto, los diferentes métodos de AOA pueden tener éxito en una especie, pero no en otra. La activación de ovocitos se puede clasificar en función del mecanismo que provoca el disparo de  $\text{Ca}^{2+}$  similar a la fertilización, siendo estos: mecánicos, eléctricos y químicos (Meerschaut et al., 2014). Sin embargo, la activación química es la estrategia más utilizada, la cual se clasifica en función de la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  que provoca en los ovocitos: transición única de  $\text{Ca}^{2+}$ , oscilaciones dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  y las independientes del gatillo o disparador inicial de  $\text{Ca}^{2+}$ , ver Figura 3 (Ferrer-Buitrago et al., 2018).

- Transición única de  $\text{Ca}^{2+}$ : ionomicina, calcimicina (A23187) y etanol.
- Oscilaciones dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$ : timerosal,  $\text{SrCl}_2$ , ésteres de forbol, alcohol anhidro y PLC $\zeta$ .
- Independientes del gatillo inicial de  $\text{Ca}^{2+}$ : 6-DMAP, estaurosporina, H7, cicloheximida, anisomicina, puromicina, roscovitina, DhL, RO-3306, butirolactona I y bohemina.

#### **2.4.1. Agentes inductores de transición única de $\text{Ca}^{2+}$**

##### **Ionóforos de $\text{Ca}^{2+}$**

Los ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$ , como la calcimicina (A23187) y la ionomicina son dos antibióticos carboxílicos, sintetizados por actinomicetos de las especies *Streptomyces chartreusensis* y *Streptomyces conglobatus*, respectivamente. Son moléculas solubles en lípidos y pueden transportar iones a través de la bicapa lipídica. Estos les confieren una alta permeabilidad a las membranas celulares para los iones de  $\text{Ca}^{2+}$ , permitiendo así la entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  en el ovocito desde el medio extracelular y el aumento de la concentración de calcio intracitoplasmático. Los ovocitos expuestos experimentan un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracitoplasmático, resultante de la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  así como también de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares, en particular del RE (Ferrer-Buitrago et al., 2018). Sin embargo, no pueden inducir oscilaciones de calcio, sino un único aumento. La exposición a los ionóforos conduce a altas tasas de activación y formación de blastocistos, sin embargo, su competencia varía para inducir la activación y la formación de blastocistos.

##### **Etanol**

De manera similar que los ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$ , el etanol provoca una sola transición de  $\text{Ca}^{2+}$ , causado por una alteración de la fluidez de la membrana seguida de una fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana (Rybouchkin et al., 1996). Al igual que con los ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$ , el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por el etanol se produce durante el tiempo que se aplica el etanol y se recupera después del lavado.

Tras incubar de 5-7 min en 7% de etanol, genera la  $\text{IP}_3$  mediante la hidrólisis de  $\text{PIP}_2$  en la membrana del ovocito para alterar la estabilidad de la membrana del mismo, inducir aumentos de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y aumentar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del almacenamiento de calcio y la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Por lo tanto, el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumenta y este aumento provoca la activación del ovocito (Han & Gao, 2013).

## **2.4.2. Agentes que inducen oscilaciones dinámicas de Ca<sup>2+</sup>**

### **Silicato de mercurio (timerosal)**

El reactivo sulfhidrilo timerosal se ha propuesto como un agente activador dada su capacidad para inducir oscilaciones de Ca<sup>2+</sup> inducidas por Ca<sup>2+</sup> (Mehlmann & Kline, 1994). El timerosal induce oscilaciones similares a la fertilización al oxidar los grupos tiol de la proteína en el IP<sub>3</sub>R. Como consecuencia, se observa una sensibilización del receptor a la concentración citosólica de IP<sub>3</sub> (Swann, 1991). A pesar de evocar oscilaciones de Ca<sup>2+</sup>, el timerosal no puede mediar la reanudación meiótica por sí solo, dado el efecto redox que ejerce sobre la proteína del citoesqueleto, lo que impide la progresión del ciclo celular (Alexandre et al., 2003). Curiosamente, el timerosal en combinación con el inhibidor redox ditioneitol (DTT) permite la activación de ovocitos en varias especies de mamíferos (Swann, 1991; Herbert et al., 1995; Machity et al., 1997; Deng & Shen, 2000).

### **Estroncio**

El cloruro de estroncio (SrCl<sub>2</sub>), es muy eficaz e induce no sólo una elevación de la concentración de Ca<sup>2+</sup>, sino también oscilaciones (Vanden et al., 2013) que son similares a las que se observan en la fertilización (Bevacqua et al., 2010; Kharche & Birade, 2013) probablemente mediante su unión a los IP<sub>3</sub>R del RE. El Sr<sup>2+</sup> libera el Ca<sup>2+</sup> de los almacenes intracelulares, lo que promueve los pulsos de Ca<sup>2+</sup> (Shirazi et al., 2009; Barbosa et al., 2013), que son inferiores en frecuencia y amplitud, pero de mayor duración que los observados durante la fertilización (Hosseini et al., 2008; Shirazi et al., 2009; Barbosa et al., 2013). Al igual que el SrCl<sub>2</sub> que provoca transitorios múltiples de Ca<sup>2+</sup> se encuentran los ésteres de forbol (Cuthbertson & Cobbold, 1985), y el alcohol anhidro (Liu et al., 2013).

### **PLCζ**

Después del descubrimiento del papel de PLCζ como desencadenante de la activación de los ovocitos, surgieron las ideas de utilizar la proteína como activador artificial. Cuando se inyecta la PLCζ humana recombinante en ovocitos, evocan oscilaciones de Ca<sup>2+</sup> que se parecen mucho a las iniciadas por los espermatozoides después de la fertilización (Kashir et al., 2011; Yoon et al., 2012). En estudios donde se inyectó ARN complementario (ARNc) de PLCζ en ovocitos en MII, también desencadena oscilaciones con un desfase de tiempo que permite la síntesis de proteínas (Saunders et al., 2002).

### **2.4.3. Agentes independientes de Ca<sup>2+</sup>**

La activación del ovocito se produce como consecuencia inmediata de la degradación completa del complejo proteico MPF, CDK1-Ciclina B, responsable de mantener al ovocito en detención meiótica (Shoji et al., 2006). Por lo tanto, el diseño de un enfoque de AOA requiere dirigirse a la degradación del MPF. Para ello, varios agentes han demostrado su capacidad para interrumpir la función del MPF en ausencia del desencadenante inicial de Ca<sup>2+</sup>.

#### **2.4.3.1. Inhibidores de amplio espectro**

Los principales mecanismos actualmente utilizados para disminuir MPF consisten precisamente en incubar en inhibidores de amplio espectro, ya sea de la síntesis y/o fosforilación de proteínas. Los principales inhibidores de la fosforilación de proteínas son el 6-DMAP, estaurosporina y H7; y para la inhibición de la síntesis de proteínas son la cicloheximida, anisomicina y puromicina.

#### **6-dimetilaminopurina**

El 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), es un inhibidor global de las proteínas quinasas con muchos objetivos a lo largo de la cascada de activación (Szollosi et al., 1993) que disminuye abruptamente los niveles de MPF y MAPK, induciendo una rápida formación de los PN e inhibiendo la extrusión del segundo CP (Liu & Yang, 1999). La desfosforilación del complejo p34<sup>cdc2</sup>-ciclina B genera un MPF activo que participa en el mantenimiento de la detención meiótica. La desfosforilación es catalizada por la fosfatasa cdc25, cuya actividad puede bloquearse inhibiendo su fosforilación mediante inhibidores de la proteína quinasa. El 6-DMAP provoca la liberación de la detención meiótica mediante la inhibición de cdc25, impidiendo así la desfosforilación, es decir, la activación de MPF. Un intervalo de 3 h entre la exposición a la ionomicina y el tratamiento con 6-DMAP es crucial para permitir la extrusión del segundo CP (Ock et al., 2003). Sin embargo, a pesar que el 6-DMAP induce altas tasas de activación, la formación de los PN y el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto en ovejas y bovinos (Liu et al., 1998; Loi et al., 1998), el problema radica en la poca selectividad por ser de amplio espectro de acción, lo que implica que no interfiere específicamente con una quinasa, sino que puede también afectar otras quinasas involucradas en procesos celulares, cuyo efecto puede ser letal en los subsecuentes eventos celulares después de la activación (Susko-Parrish et al., 1994). Más aún, este compuesto causa daños en el ADN, reflejados en el



patrón anormal de cariocinesis en el primer ciclo celular, y además incrementa la incidencia de anomalías cromosómicas en partenotes y embriones clonados (Bhak et al., 2006).

#### **Estaurosporina y H7**

La estaurosporina y la H7, son inhibidores inespecíficos de las proteínas quinasas, da lugar a la reanudación de la meiosis sin la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y a la formación de los PN en oocitos de ratón y de cerdo (Mayes et al., 1995; Wang et al., 1997).

#### **Cicloheximida**

Es un inhibidor global *de novo* de la síntesis de proteínas que altera el equilibrio al interrumpir la síntesis continua de la ciclina B, en consecuencia, reduce los niveles de MPF (Yang et al., 1994; Moses & Kline, 1995; Suttner et al., 2000; Rogers et al., 2006).

#### **Anisomicina**

Inhibe la síntesis de proteínas, actúa específicamente en la fase de traducción (Arias et al., 2016). Felmer & Arias (2015) demostraron que mejora la calidad de los blastocistos y reduce la aparición de anomalías cromosómicas, es decir, presentan una ploidía normal en la activación partenogenética y de los embriones reconstruidos de transferencia nuclear de células somáticas (SCNT). La anisomicina ha dado lugar a tasas de desarrollo superiores de los embriones resultantes, en comparación con la cicloheximida y el 6-DMAP (Felmer & Arias, 2015; Arias et al., 2016).

#### **Puromicina**

Es un inhibidor de la síntesis de proteínas que alivian la detención meiótica al interrumpir la síntesis continua de la ciclina B (De Sutter et al., 1992; Lu et al., 2006).

### **2.4.3.2. Inhibidores específicos**

#### **Roscovitina**

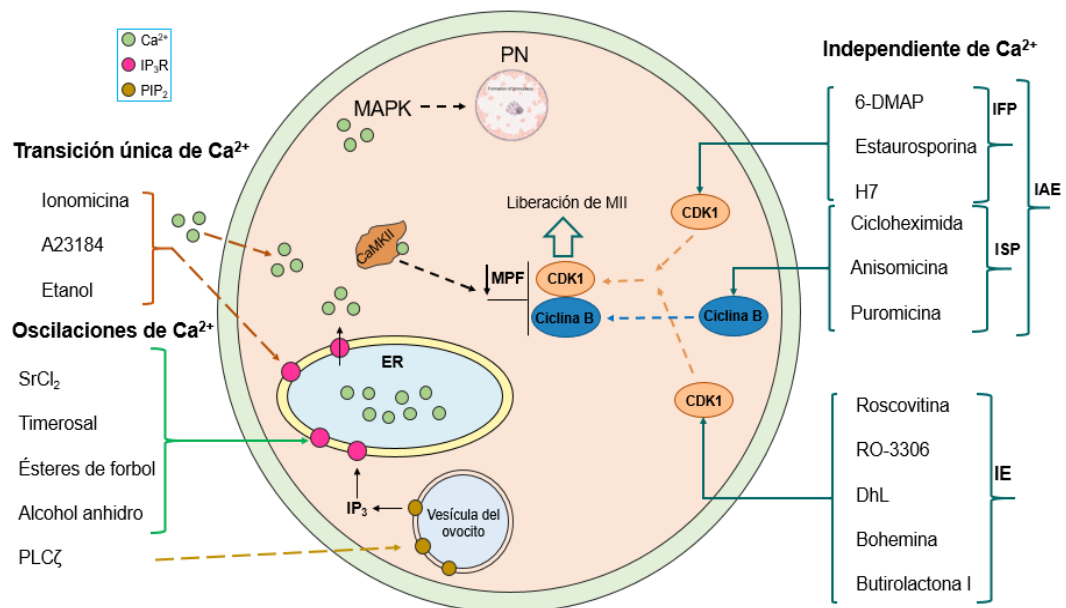
La roscovitina (Rosc), inactiva el MPF inhibiendo la desfosforilación de  $\text{CDK1/p34}^{\text{cdc2}}$  y bloqueando su sitio de unión al ATP (Phillips et al., 2002; Albarracín et al., 2005). De manera similar a la Rosc, la deshidroleucodina (DhL), inhibe el MPF al interrumpir la fosforilación de  $\text{p34}^{\text{cdc2}}$  (Toranzo et al., 2010; Canel et al., 2010; Vichera et al., 2010). Al igual que la Rosc y DhL, la RO-3306 inhibe el MPF al inhibir la CDK1.

## Butirolactona I

Es un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina, inhiben selectivamente la subunidad catalítica de la MPF y pueden utilizarse para conseguir una alta tasa de formación de blastocistos de buena calidad (Dinnyés et al., 1999).

## Bohemina

Es un CDK1 sintético derivado de la citoquinina, es un potente CDK1 totalmente reversible. La actividad inhibidora específica de CDK1 de la bohemina permite el estudio del papel de la inhibición de MPF en la activación de los ovocitos en diferentes especies.



**Figura 3.** Métodos de activación química en ovocitos.

CaMKII: quinasa II dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina, MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos, PN: pronúcleo, MPF: factor promotor de la maduración, CDK1: quinasa dependiente de ciclina 1, ER: retículo endoplasmático,  $IP_3$ : inositol 1,4,5-trifosfato,  $IP_3R$ : receptor del  $IP_3$ ,  $PIP_2$ : fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, IE: inhibidores específicos, IAE: inhibidores de amplio espectro, ISP: inhibidores de la síntesis de proteínas; IFP: Inhibidores de la fosforilación de proteínas.

## 2.5. Producción *in vitro* de embriones

La tecnología de producción *in vitro* (PIV) de embriones, representa una biotecnología de gran trascendencia productiva para el mejoramiento genético de animales élite como también para preservar especies de interés, esta técnica aún no está bien desarrollada en los camélidos en comparación con otras especies. La singularidad de la fisiología reproductiva de las distintas especies no permite extrapolar directamente los sistemas de PIV de una especie a otra. No obstante, aunque se espera un gran progreso en este campo para establecerlo de forma rutinaria en los camélidos, se ha acumulado información

sobre todos los pasos de este proceso (Skidmore et al., 2020). La PIV de embriones, puede ser mediante los métodos como la FIV convencional, ICSI, partenogénesis y clonación por SCNT o bipartición, tanto la FIV convencional y la ICSI pasan por tres etapas fundamentales: maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos, fecundación *in vitro* (FIV) de los ovocitos madurados y cultivo *in vitro* (CIV) de los embriones.

### **2.5.1. Maduración *in vitro***

#### **2.5.1.1. Obtención de ovarios**

Los ovocitos pueden recogerse de animales vivos o tras la ablación ovárica de un animal sacrificado (Moawad et al., 2020). La fuente tradicional de ovocitos para la PIV de embriones son los ovarios de matadero que proporcionan un gran número de ovocitos competentes y es un requisito fundamental para la PIV en cualquier especie. Los ovarios de los mataderos, al ser la fuente más barata y abundante de ovocitos, se utilizan para la producción a gran escala de ovocitos maduros en la mayoría de las especies animales. Sin embargo, debido al limitado número de mataderos en todo el mundo, esta fuente es insuficiente en los camélidos (Wani, 2021). En la mayoría de los estudios, los ovarios recogidos en el matadero se han transportado al laboratorio en solución salina normal (SSN) o en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 30-37 °C (Del Campo et al., 1992; Fathi et al., 2018) siendo estos recogidos inmediatamente después de su sacrificio. Pueden ser almacenados en solución salina normal a temperatura ambiente durante un máximo de 12 horas, sin ningún efecto perjudicial en la tasa de maduración de los ovocitos recogidos, sin embargo, las fluctuaciones en la temperatura de los medios de mantenimiento durante su almacenamiento afectan negativamente a las tasas de maduración de los ovocitos (Wani & Nowshari, 2005).

#### **2.5.1.2. Recuperación de los complejos ovocito-cumulus**

En los camélidos, se han descrito varios métodos para la recolección de ovocitos de animales después del sacrificio como la excisión de los folículos de los ovarios y la separación de los mismos con 2 agujas (Nowshari, 2005), la aspiración del contenido de los folículos con una aguja conectada a una jeringa o la presión constante de una bomba de vacío (Ruiz et al., 2017; Wani & Hong, 2018; Fathi et al., 2018), el *slicing* del ovario con una cuchilla (Abdoon, 2001; Torner et al., 2003), o el picado del ovario (Del Campo et al., 1994), y en alpacas se han reportado tres técnicas como la aspiración folicular, *slicing* folicular

(incisión de la superficie del folículo del ovario) y disección-ruptura folicular (Gomez et al., 2013). Estas técnicas nos permiten recuperar los complejos ovocito-*cumulus* (COCs) usando folículos no ovulatorios, que bajo condiciones fisiológicas normales se tornarían en folículos atrésicos lo cual es de mucha importancia para lograr el máximo aprovechamiento del potencial genético de una donadora mediante procedimientos *in vitro* (Gordon & Lu, 1990).

La aspiración de los folículos visibles mediante una jeringa o una bomba de vacío es más sencilla y ha sido el método más comúnmente empleado en los camélidos porque el picado o el corte de los ovarios produce una reserva de COCs de folículos pequeños que no maduran bien y tienen un potencial de desarrollo muy bajo después de la maduración y la cantidad de restos y células sanguíneas dificulta la búsqueda de los COCs en la placa de búsqueda (Skidmore et al., 2020). El calibre de la aguja utilizada para la aspiración de los folículos afecta a la calidad y al número de COCs obtenidos. La aspiración con una aguja de calibre 20 G produce un mayor número de ovocitos totales y de categoría I que una aguja de 18 o 19 G (Abdoon, 2001). Por otro lado, la extirpación de los folículos y separarlos bajo un estereomicroscopio previo corte de los tejidos circundantes y lavadas varias veces con solución salina estéril, aunque requiere mucho tiempo, podría utilizarse si sólo se van a procesar unos pocos ovarios, ya que produce más COCs y de mejor calidad (Nowshari, 2005).

Para la búsqueda de los COCs de ovarios del matadero, se han utilizado medios como el TCM 199 tamponado con HEPES, la solución salina normal o la solución salina tamponada con fosfato suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Ferré et al., 2020; Sansinena et al., 2007; Versieren et al., 2010; Wani & Hong, 2018).

### **2.5.1.3. Selección y clasificación de ovocitos**

Una etapa crítica en el procedimiento de PIV es la selección de ovocitos de buena calidad para poder garantizar la maduración *in vitro* y su posterior desarrollo embrionario. La selección se realiza generalmente en base a varios criterios como son el estadio nuclear, diámetro del ovocito, características citoplasmáticas, aspecto de la corona radiada y expansión o distribución de las células del cúmulo (Chen, 1986; Xu et al., 1986; Younis et al., 1989; Watanabe et al., 1998).

Dentro de la PIV de embriones, los aspectos más importantes que se evalúan en la calidad de ovocitos, es la presencia de los COCs, con un mínimo de 5 capas

que cubran la totalidad de la superficie del ovocito, el citoplasma sea de color gris oscuro uniforme y no contenga manchas (Palma, 2001). Para la clasificación de los ovocitos en los camélidos sudamericanos (CSA), muchos investigadores acogieron la clasificación propuesta por Ratto et al. (2005), clasificación que está de acuerdo a la compactación de cúmulo y su aspecto citoplasmático.

**Tabla 1.** Clasificación de los complejos ovocito-*cumulus*.

Categorías	Características por categoría
I	COCs con cúmulos de capas múltiples (> 5 capas), compacto y citoplasma homogéneo.
II	COCs parcialmente rodeados por células del cúmulo (entre 2-4 capas), y con citoplasma homogéneo.
III	COCs con cúmulo ≤ 1 capa de granulosa o en partes desnudos y citoplasma variado.
IV	Incluye a los ovocitos desnudos y con citoplasma granular.

Ratto et al. (2005)

#### 2.5.1.4. Maduración *in vitro* de ovocitos

La mayoría de los ovocitos de camélidos recogidos de ovarios del matadero o de animales vivos que no han sido inyectados con GnRH antes de la aspiración de los folículos, se encuentran en la fase de vesícula germinal (GV) y necesitan ser cultivados *in vitro* para alcanzar la fase M-II (Skidmore et al., 2020). La maduración *in vitro* es un paso importante y un requisito previo para la PIV de embriones, esto comprende tanto la maduración nuclear y citoplasmática, durante lo cual sufren cambios con el fin de preparar para ser fecundados con éxito y desarrollarse posteriormente.

Bajo condiciones de laboratorio, la maduración nuclear y citoplasmática se han realizado utilizando medios de cultivo clasificados en medios simples y complejos (Gordon, 1994). En la MIV de ovocitos de camélidos, se han utilizado diferentes medios de cultivo como el medio de tejidos-199 (TCM-199), el medio CR-1aa, Hams F-10, y el medio CMRL-1066. (Nowshari, 2005; Wani & Nowshari, 2005; Ratto et al., 2007; Trasorras et al., 2009; Wani & Skidmore, 2010; Ruiz et al., 2017), siendo el TCM-199 superior sobre el CR-1aa o el medio CMRL-1066 para la maduración de ovocitos (Nowshari, 2005; Torner et al., 2003). En la mayoría de los estudios, el medio se complementa con un 10% de FCS, 0,25 mg/ml de piruvato, 50 µg/ml de gentamicina, 10 µg/ml de FSH, 10 µg/ml de LH y 1 µg/ml de estradiol, y en algunos casos también se han añadido 500 µg/ml de cisteamina (Khatir et al., 2004) o L-glutamina y bicarbonato sódico (Wani & Wernery, 2010; Ruiz et al., 2017).

Existen reportes con respecto al tiempo adecuado de maduración nuclear y citoplasmático en camélidos, variando desde 24-40 h. En dromedarios la MIV de los ovocitos fueron reportados de 32-36 h como óptimos (Abdoon, 2001; Torner et al., 2003; Wani, 2009); sin embargo, los estudios sobre la cinética y la ultraestructura de los oocitos durante su maduración nuclear (Brogliatti et al., 2000; Kafi et al., 2005; Wani & Nowshari, 2005) y el potencial de desarrollo después de la activación química (Wani, 2008) sugieren que el tiempo de cultivo óptimo es de alrededor de 28-30 h. También se ha observado una configuración anormal de la cromatina y cambios degenerativos después de 40 h de cultivo (Kafi et al., 2005). En dromedario, la activación de los ovocitos después de 28 h de maduración *in vitro*, con ionomicina y posterior cultivo en 6-DMAP, da resultados óptimos y mayores tasas de producción de blastocistos (Wani, 2008), lo que indica una maduración citoplasmática completa y preparada para sostener un mejor desarrollo alrededor de este tiempo (Wani, 2021).

### **2.5.2. Fecundación *in vitro***

La fecundación *in vitro*, se define como la unión de los ovocitos maduros rodeados de células del *cumulus* con los espermatozoides seleccionados y capacitados en una placa de cultivo, por lo tanto, dicho proceso se realiza fuera del tracto genital femenino. Sin embargo, esta definición ha sido hoy en día modificada con el desarrollo de la técnica ICSI, que se considera una variante de la FIV convencional o clásica.

#### **2.5.2.1. Recuperación, selección y capacitación espermática**

Los espermatozoides pueden ser recuperados en animales vivos por los métodos como la vagina artificial, electroeyaculación, fundas vaginales, aspiración vaginal postcoital y desviación de los conductos deferentes (Curie, 2008), o a partir del epidídimo de los testículos de animales muertos o de animales castrados.

Tradicionalmente se conocen tres grupos de técnicas de selección y capacitación espermática, como las técnicas de migración (*Swim up*, *Swim down*, Sedimentación migración), gradientes de densidad (*Percoll*, Puresperm, Isolate, Suprasperm) y filtración (lana de vidrio, columna de Sephadex) de los cuales los más utilizados son las de migración y los gradientes que permiten seleccionar a los espermatozoides motiles del plasma seminal, detritos, células inmaduras y del diluyente. El *Swim up* se lleva a cabo mediante la deposición de *pellet* en el fondo de un tubo de ensayo con el medio adecuado y se incuba por

espacio de 30 a 60 min a una temperatura de 37 a 38,5 °C y con un ángulo  $\leq 45^\circ$  para aquellas muestras con poca motilidad espermática y a  $> 45^\circ$  para aquellas muestras con alta motilidad y concentración espermática. El ascenso de los espermatozoides está directamente relacionado con la temperatura y el tiempo de incubación, pero principalmente se basa en la capacidad de su motilidad, así en la superficie del medio estarán los espermatozoides que presentan una mejor movilidad rectilínea progresiva, pero esta técnica no proporciona ninguna selección basado en la morfología normal de la cabeza, la integridad de la cromatina e integridad acrosomal (Somfai et al., 2002). La principal desventaja es la baja tasa de recuperación con 10-20% (Hallap et al., 2004), sin embargo, la recuperación de los espermatozoides aumenta en 50 -100% cuando se incuba  $30^\circ$  en comparación de una incubación vertical (Purvis & Egdetveit, 1993; Palma, 2001). En el método de *Percoll*, los espermatozoides se seleccionan en virtud de su velocidad potencial y su relativa alta densidad. La muestra de semen es colocada en la parte superior de la gradiente, el cual posee una concentración diferencial de 45/90 % o 22,5/45 %, y luego se procede a centrifugar, aquellos espermatozoides viables se concentran en el fondo del tubo, quedando en las fases del gradiente los espermatozoides muertos o de baja movilidad, el plasma seminal, diluyente y demás estructuras (Parrish et al., 1995; Dode et al., 2002; Kochhar et al., 2003).

Durante la selección de los espermatozoides morfológicamente normales y móviles, éstos deben ser capacitados. La capacitación puede ser lograda con la exposición de los espermatozoides a diferentes sustancias o productos que segregan las células, como las del cúmulo. Las sustancias más utilizadas como agentes capacitantes son la cafeína (Niwa & Ohgoda, 1988; Nedambale et al., 2006), heparina (Niwa & Ohgoda, 1988; Parrish et al., 1988), mezcla de penicilamina, hipotaurina y epinefrina, abreviada como PHE (Gordon, 1994) y BSA (Thomas et al., 2006). Durante el proceso de capacitación se producen una serie de alteraciones bioquímicas en la célula, como los cambios estructurales asociados a los cambios lipídicos en las membranas, metabolismo energético del espermatozoide, alteraciones de los canales de iones, modulación de la actividad de ciertas enzimas, y la fosforilación de proteínas (Visconti et al., 2011).

#### **2.5.2.2. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides**

La ICSI es una técnica de fecundación *in vitro* que se ha realizado en muchas especies como bovinos, caprinos, ovinos, equinos, porcinos, ratones, camélidos

y humanos, la técnica consiste en la introducción de un único espermatozoide previamente seleccionado en el interior de su citoplasma del ovocito maduro MII, este procedimiento evita la unión del espermatozoide a la zona pelúcida y la penetración a través de éste, y la unión de sus membranas plasmáticas entre el ovocito y el espermatozoide. Con esta técnica se pueden obviar acontecimientos que sufren los espermatozoides como la capacitación y la reacción acrosómica, que tienen lugar en el tracto reproductor femenino, la maduración en el epidídimo e incluso la espermiogénesis en el testículo (Yanagimachi, 1998). En la fecundación por ICSI, la membrana plasmática y el contenido acrosómico del espermatozoide entran al citoplasma del ovocito, además de una pequeña cantidad del medio extracelular, por lo que los ovocitos tienen que realizar un trabajo extra para liberarse de la membrana plasmática y acrosomal del espermatozoide, diversas macromoléculas agregadas a la membrana plasmática del espermatozoide durante la maduración en el epidídimo y eyaculación, del contenido acrosomal con un espectro de enzimas hidrolíticas y glicoproteínas, y los componentes del medio durante la inyección de los espermatozoides (Yanagimachi, 2005).

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides comprende una serie de aspectos técnicos como la inmovilización de los espermatozoides, posicionamiento del CP, aspiración y expulsión del citoplasma del ovocito, y finalmente la liberación del ovocito (García, 2008).

La inmovilización común de los espermatozoides es la rotura mecánica de la cola mediante un golpe suave en el flagelo del espermatozoide con la pipeta de inyección y el fondo de la placa, lo que se consigue con un movimiento fino y rápido de la parte biselada de la pipeta de inyección, esto permite un daño en la membrana plasmática lo cual permitiría la reacción acrosómica, estimula cambios en el espermatozoide necesarios para inducir la activación ovocitaria y facilita la descondensación y posterior formación del PN masculino, previene daños en las estructuras celulares del ovocito por el movimiento activo del flagelo del espermatozoide (Dozortsev et al., 1995; Kasai et al., 1999).

Hay mucha controversia con respecto a la posición óptima del primer CP, ya que se ha asociado con la supuesta ubicación del huso meiótico (Hardarson et al., 2000), aunque la posición del CP no siempre es una guía real de la localización de la placa metafásica, por lo tanto, los ovocitos se deben inyectar lo más lejos posible del corpúsculo. Durante la meiosis, el huso meiótico es responsable de la



alineación y separación normal de los cromosomas, por lo que cualquier alteración del huso meiótico puede conducir a la reordenación de los cromosomas en el citoplasma y puede contribuir a la aneuploidía tras la fecundación (Pickering et al., 1988), por tanto, para evitar daños es necesario posicionar el primer cuerpo polar a las 6 o a las 12 horas y el inyectar de los espermatozoides en el ovocito entre las 3 y las 9 horas (Nagy et al., 1995; Palermo et al., 1995); sin embargo, en un estudio realizado por Blake et al. (2000), demostró que la ubicación del huso meiótico en relación con la deposición del espermatozoide puede afectar a la tasa de fecundación, así como el desarrollo embrionario, sugiriendo que el cuerpo polar no se debe colocar a las 5, 6, 8, 9, 10, 12 y 1 horas debido al potencial retraso en la singamia pronuclear, siendo las 7 y 11 horas con mayores tasas de fecundación, desarrollo y calidad embrionaria (Blake et al., 2000; Anifandis et al., 2010). La ubicación del cuerpo polar es sólo una medida aproximada de la posición del huso (Silva et al., 1999), ya que no siempre coinciden, tal y como demuestran la inmunotinción o la poliscopea (Wang et al., 2001).

La inyección de un ovocito se puede ver dificultada por las características propias de éste ya que no todos los ovocitos responden igual a la inyección y ofrecen una resistencia variable cuando se pretende atravesar la membrana plasmática y la zona pelúcida. Durante la inyección el ovocito puede deformarse por los posibles daños del citoesqueleto, esto por la dificultad de pasar la zona pelúcida, ocasionando la degeneración de los ovocitos debido al daño ocasionado por la pipeta de inyección.

La aspiración del citoplasma del ovocito provoca la rotura de la membrana citoplasmática y nos aseguramos de que nos encontramos en el interior del ovocito. Algunos estudios demuestran que una vigorosa aspiración, incluso permite unos porcentajes de fecundación mayores que una aspiración suave (Tesarik & Sousa, 1995), y por último después de la aspiración citoplasmática el contenido aspirado es devuelto juntamente con el espermatozoide con un poco de medio extracelular para luego retirar la pipeta de inyección y liberar al ovocito de la pipeta holding.

### **2.5.2.3. Activación de ovocitos**

Como se mencionó previamente, existen muchos protocolos de activación de ovocitos, siendo la activación química más utilizada. Estos compuestos químicos ejercen diferentes mecanismos para activar los ovocitos como aumentar por

única vez u oscilar la  $[Ca^{2+}]_i$  y la inhibición de la fosforilación o síntesis de proteínas (Ferrer-Buitrago et al., 2018; Hosseini et al., 2008), sin embargo, la activación de ovocitos dan resultados inconsistentes entre las especies estudiadas (Rho et al., 1998; Chung et al., 2000; Galli et al., 2003; Tasripoo et al., 2012). En la actualidad, hay muy pocos reportes del uso de activadores para la activación en ovocitos inyectado en camélidos, de las cuales solo se menciona la ionomicina/roscovitina (Wani & Hong, 2018), ionomicina y ionomicina/6-DMAP (Sansinena et al., 2007; Conde et al., 2008; Castro-Modesto et al., 2022).

### **2.5.3. Cultivo *in vitro***

Las condiciones de cultivo no sólo influyen en el desarrollo de los embriones *in vitro*, sino que también afectan a su desarrollo *in vivo* e incluso a la salud de las crías tras su nacimiento (Mantikou et al., 2013). Por lo tanto, se debe seleccionar un medio de cultivo, que es un entorno extraño para el embrión producido *in vitro*, con el fin de minimizar el estrés para el embrión cultivado. En el cultivo de embriones, se han utilizados medios simples o únicos y medios secuenciales, en el caso de los medios simples, el embrión permanece en dicho medio durante todo el tiempo con un recambio al día tres de cultivo o sin recambios cuando el medio de cultivo tiene un volumen considerable, mientras que, en los medios secuenciales, el embrión es cultivado en un medio de desarrollo hasta la etapa de mórula, posteriormente es cambiado a otro medio para que alcance la etapa de blastocisto (Cevik et al., 2014; Hosseini et al., 2015; Vazquez-Avenida et al., 2017; Sfontouris et al., 2017).

En los CSA, se han utilizado con éxito para el cultivo de embriones medios como el fluido oviductal sintético (SOF) con aminoácidos añadidos y ha sido utilizado para el cultivo de embriones en la mayoría de los estudios reportados (Conde et al., 2008; Trasorras et al., 2012; Landeo et al., 2017; Ruiz et al., 2017), y con pocos reportes en el uso de DMEM-F12 (Trasorras et al., 2012, 2014), CR1 (Sansinena et al., 2007), KSOM (Laines-Arcce et al., 2021) y cultivo secuencial con los medios KSOM y SOF (Huanca et al., 2010).

En la mayoría de los estudios, los embriones se cultivan a 38,5 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 90% de N<sub>2</sub> en el aire hasta el día 7. El cultivo de embriones a un nivel de O<sub>2</sub> del 20 % frente al 5 % no parece afectar al desarrollo embrionario en las alpacas (Ruiz et al., 2017); sin embargo, se ha observado una mejor tasa de producción de blastocistos a niveles de O<sub>2</sub> del 5-7

% en el cultivo de embriones de dromedario (Wani & Wernery, 2010; Wani & Hong, 2018). Cabe mencionar que la cinética del desarrollo embrionario es más rápida tanto *in vitro* como *in vivo* en los camélidos, llegando así al estadio de blastocisto en el D5, y la mayoría de ellos eclosionan en el D6 del CIV.

#### **2.5.3.1. Evaluación del estadio de desarrollo embrionario**

Los criterios de acuerdo a las pautas de la Sociedad Internacional de Tecnología Embrionaria (IETS), se toman para evaluar los estadios de desarrollo embrionario (Stringfellow & Seidel, 1998; Bó & Mapletoft, 2018).

**Sin segmentación de células (código 1):** Están presente aquellos ovocitos no fecundados o un embrión de una célula (zigoto).

**Segmentación 2-12 células (código 2):** Embrión de 2 a 12 células. Se puede distinguir los blastómeros en las primeras divisiones. La masa celular del embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.

**Mórula temprana (código 3):** Una masa de al menos 16 células. Los blastómeros individuales son difíciles de distinguir unos de otros. La masa celular del embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.

**Mórula compacta (código 4):** Una masa de al menos 32 blastómeros hasta los 64 blastómeros, Los blastómeros individuales se han unido, formando una masa compacta. La masa embrionaria ocupa del 60 al 70 % del espacio perivitelino.

**Blastocisto temprano (código 5):** Se presenta desde las 100 células. Embrión que ha formado una cavidad llena de líquido o blastocele. El embrión ocupa entre el 70 y el 80% del espacio perivitelino. En este estadio, es difícil diferenciar la masa celular interna de las células del trofoblasto.

**Blastocisto (código 6):** Es evidente la diferenciación visual entre el trofoblasto y la masa celular interna. El blastocele es muy prominente y el embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.

**Blastocisto expandido (código 7):** El diámetro total del embrión aumenta drásticamente, con un adelgazamiento simultáneo de la zona pelúcida hasta aproximadamente un tercio de su grosor original.

**Blastocisto eclosionado (código 8):** Los embriones pueden estar en proceso de eclosión o haber perdido completamente la zona pelúcida. Los blastocistos eclosionados pueden ser esféricos con un blastocele bien definido o pueden estar colapsados.

**Blastocisto expandido eclosionado (código 9):** El blastocisto es idéntico al estadio anterior, excepto por su tamaño.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Ubicación de la zona de estudio

La investigación fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ubicado en el distrito de Andrés Avelino Cáceres Dorregaray de la provincia de Huamanga, región Ayacucho, a una altitud de 2735 msnm, con coordenadas UTM, Zona (Z): 18 L, Coordenada Este (X): 586182.71 m, Coordenada Norte (Y): 8544663.29 m, Hemisferio sur, según Google Earth.

#### 3.2. Colecta de muestras

Las muestras biológicas (ovarios y testículos) fueron colectadas en el Matadero Municipal de Huancavelica situado a 7 km de la ciudad, a una altitud de 3779 msnm, con coordenadas UTM, Zona (Z): 18 L, Coordenada Este (X): 495938.60 m, Coordenada Norte (Y): 8586021.37 m, Hemisferio sur, según Google Earth.

#### 3.3. Población y muestra

La población estuvo conformada por todos los ovocitos en metafase II posterior a la maduración *in vitro*, y se tomó como muestra 115 ovocitos microinyectados con un espermatozoide de manera no probabilística según las características del ovocito, considerando criterios de inyección de un espermatozoide, morfología homogénea y daño de la zona pelúcida.

#### 3.4. Maduración *in vitro* de ovocitos

##### 3.4.1. Colecta de ovarios

Los ovarios fueron colectados de animales faenados (*post mortem*). Inmediatamente después de que el animal fue eviscerado, los ovarios fueron extraídos y limpiados, luego colocados en una bolsa de plástico que contenía solución salina fisiológica (SSF) con 80 µg/ml de gentamicina. Después de coleccionar los ovarios, la bolsa fue colocada en una caja isotérmica con gel refrigerante para mantener la temperatura durante el transporte.

### **3.4.2. Recuperación y clasificación de los ovocitos**

En el laboratorio, los ovarios fueron limpiados de tejidos circundantes y seguida de 3 lavadas en SSF con 80 µg/ml de gentamicina a temperatura ambiente para eliminar la sangre, luego, con una aguja se limpió aquellos folículos mayores a 8 mm de diámetro y seguidamente se lavaron varias veces en SSF con 80 µg/ml de gentamicina a temperatura ambiente; un vez lavado los ovarios, fueron colocados en un vaso de precipitado de 500 ml que contenía 200 ml de SSF con 80 µg/ml de gentamicina atemperada a 37 °C en Baño María.

Los COCs fueron recuperados de los folículos por la técnica de cortes (*slicing*), para lo cual, los ovarios fueron secados con paños absorbentes, luego fueron colocados en una placa de Petri de 90 x 15 mm que contenía de 5-10 ml de medio de manipulación (ver Anexo 4) a 37 °C, después se procedió a diseccionar los folículos de 2-7 mm de diámetro con una hoja de bisturí N° 21.

La búsqueda de los COCs fue realizada con la ayuda de un estereoscopio con un aumento de 20X previsto de una platina térmica a 37 °C. Todos los COCs fueron transferidos a una placa de Petri de 35 x 15 mm que contenía medio de manipulación atemperado a 37 °C, seguidamente fueron clasificados (categoría I, II, III y IV, ver Tabla 1 y Anexo 20) según el criterio morfológico en el aspecto citoplasmático y las capas de las células que rodean (De Loos et al., 1989; Ratto et al., 2005).

Para la maduración *in vitro*, se seleccionó COCs de categoría I, II y III, estos fueron lavados 3 veces en una placa de Petri de 35 x 15 mm que contenía medio de manipulación a 37 °C, finalmente se lavó en 4 gotas de 100 µl de medio de maduración a 37 °C, ver Anexo 14.

### **3.4.3. Maduración *in vitro* de ovocitos**

Los COCs seleccionados, fueron colocados en el medio de maduración, constituido por TCM-199 (M-4530, Sigma), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS); 0,6 mM de piruvato de sodio; 2,5 µg/ml de hormona folículo estimulante (FSH); 2,5 µg/ml de hormona luteinizante (LH); 29,2 µg/ml L-glutamina; 0,2 µg/ml de 17β-estradiol; 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF); 50 ng/ml de factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) y 50 µl/ml de gentamicina, ver Anexo 5. Antes de colocar los ovocitos en el medio de maduración, el medio fue equilibrado en la incubadora de CO<sub>2</sub> en placas 4-Well con 500 µl de medio por un tiempo de 2 h.

Los ovocitos fueron distribuidos al azar de 15-20 ovocitos por pocillo y finalmente las placas se colocaron en una incubadora por un tiempo de 30 h a una

temperatura de 38,5 °C; con una atmósfera 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa.

### **3.5. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides**

#### **3.5.1. Recuperación, selección y capacitación de los espermatozoides**

Los testículos fueron colectados en el Matadero Municipal de Huancavelica y se transportaron al laboratorio en una caja isotérmica con gel refrigerante y envueltos en papel toalla. En el laboratorio, los testículos se limpiaron y se secaron con papel toalla, seguidamente se procedió a desencapsular con una hoja de bisturí N° 21 con un corte a nivel de las tunicas para liberar los testículos y los epidídimos, luego se procedió a separar el cordón espermático. En una placa de Petri de 35 x 15 mm, se dispuso de gotas de 200 µl de solución dilutora AndroMed® (1:4 - dilutor: agua Milli-Q) a temperatura ambiente, después se procedió a realizar cortes transversales en la cola del epidídimo (*Cauda*), seguidamente se sumergió en las gotas para recuperar los espermatozoides, luego se evaluó la concentración y motilidad en el microscopio. Aquellas gotas con espermatozoides que estuvieron dentro de los parámetros, fueron colocadas en microtubos de 1,5 ml y guardadas en refrigeración (~ 4°C) por 32 h, ver Anexo 13.

La selección y capacitación, fueron realizados mediante la técnica de *Swim up*; para ello, primeramente, se lavaron 2 veces en Sperm TALP (sp-TALP, ver Anexo 6), que consistió en colocar 100 µl de espermatozoides atemperado a 37 °C en 1 ml de medio sp-TALP (equilibrado por 1 h) luego se centrifugó a 307 x g durante 3 min, seguidamente se tomó 100 µl de sedimento y se colocó en 1 ml de sp-TALP para ser nuevamente centrifugado a 307 x g durante 3 min, luego, se tomó una alícuota de 40 µl del sedimento y se colocó en el fondo de un microtubo de 1,5 ml que contenía 500 µl de sp-TALP y se incubó durante 1 h a 45° con una temperatura de 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación, ver Anexo 15. Transcurrido el tiempo, se tomó 20 µl de medio de la parte superior y se colocó en un microtubo de 0,5 ml, seguidamente se observaron con un microscopio para determinar la motilidad, concentración y aglutinación.

#### **3.5.2. Denudación y selección de ovocitos maduros**

Transcurrido las 30 h de maduración *in vitro*, se evaluó la expansión de las células del cúmulo según los criterios de Lorenzo (1992), los ovocitos con expansión media y máxima fueron juntadas en una placa 4-Well y se procedió a denudar por pipeteo que consistió en la aspiración y expulsión de repetidas

veces en hialuronidasa con la ayuda de una micropipeta de capacidad de 100  $\mu$ l, seguidamente los ovocitos fueron llevados a TALP-HESPES para la búsqueda de los corpúsculos.

La búsqueda de los ovocitos maduros fue realizada con la ayuda de un estereoscopio con un aumento de 20X previsto de una platina térmica a 37 °C. Para visualizar los corpúsculos, los ovocitos se giraron con una micropipeta de 10  $\mu$ l, los ovocitos con un CP visible fueron seleccionados y se lavaron varias veces en medio TALP-HEPES, Luego, los ovocitos se colocaron en el medio de MIV y se dejaron en la incubadora hasta ser inyectados con un espermatozoide, ver Anexo 16.

### **3.5.3. Microinyección**

La inyección fue realizada en una placa de Petri de 35 x 15 mm, para ello, se dispuso de 5 microgotas cubiertas en aceite mineral: la primera, de 10  $\mu$ l con PVP al 5%; la segunda, de 10  $\mu$ l con PVP al 5% más 2  $\mu$ l de la suspensión de espermatozoides capacitados; y las tres siguientes de 20  $\mu$ l con medio de inyección. Luego, la placa de inyección fue atemperada a 37 °C por 10 min, seguidamente con una micropipeta de 10  $\mu$ l se colocó de 10 a 15 ovocitos maduros en el medio de inyección.

La inyección fue realizada con un micromanipulador previsto de una platina térmica a 37 °C. Una vez preparada la placa se procedió a la microinyección, para ello, se seleccionó los espermatozoides con motilidad progresiva y morfología normal, luego se procedió a inmovilizar con la pipeta de inyección, seguidamente se aspiró por la cola hacia la pipeta, después, la pipeta de inyección fue llevada a la microgota que contenía los ovocitos. Un ovocito fue sujetado con la pipeta holding y el CP fue orientado a las 6-7 o 11-12 en punto para evitar daños en la placa metafásica, luego, la inyección fue realizada a las 3 o 9 en punto presionando con la pipeta de inyección para atravesar la zona pelúcida y la membrana plasmática (oolema). Se aspiró una pequeña cantidad de citoplasma para confirmar que se había atravesado la membrana plasmática del ovocito, y el espermatozoide se inyectó en el interior del citoplasma devolviendo el contenido más el espermatozoide y el medio extracelular. Por último, se retiró la pipeta de inyección y se liberó al ovocito, ver Anexo 17.

Los ovocitos inyectados se lavaron en TCM-HEPES suplementado con FBS al 10%, ver Anexo 7, y se mantuvieron en la incubadora hasta ser activados químicamente.

### **3.5.4. Activación química de ovocitos post-ICSI**

#### **3.5.4.1. Etanol (EtOH)**

El medio basado en etanol fue preparado según lo detallado por Tasripoo et al. (2012), ver Anexo 8, y la activación se realizó de acuerdo al método descrito por Emuta & Horiuchi (2001), donde los ovocitos inyectados se colocaron en el medio de mantenimiento post-ICSI durante 4 h en la incubadora a 38,5 °C y 5% de CO<sub>2</sub> previo tres lavados en dicho medio. La activación fue realizada en 50 µl de Etanol al 7% durante 4 min a temperatura ambiente. Luego, se lavó 1 vez en TALP-HEPES y tres veces en el medio de cultivo, seguidamente fueron cultivados, ver Anexo 18.

#### **3.5.4.2. Ionomicina (Io)**

La activación con ionomicina se hizo de acuerdo al protocolo descrito por Tasripoo et al. (2012), donde los ovocitos inyectados se lavaron 3 veces en el medio de mantenimiento post-ICSI y luego se dejaron durante 30 min en la incubadora a 38,5 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después, los ovocitos fueron incubados con 500 µl de ionomicina a 5 µM durante 5 minutos a una temperatura de 38,5 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego, se lavaron tres veces y se cultivaron en el medio de cultivo, ver Anexo 18.

#### **3.5.4.3. Ionomicina (Io) / Etanol (EtOH)**

Los medios para la activación combinada de ionomicina y etanol fue preparado según lo detallado anteriormente, ver Anexo 8 y 9, y la activación se adoptó al método descrito por Bevacqua et al. (2010), donde los ovocitos inyectados se lavaron tres veces en el medio de mantenimiento post-ICSI y luego se dejaron durante 30 min en la incubadora a 38,5 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después, los ovocitos fueron incubados con 500 µl de ionomicina a 5 µM durante 5 minutos a una temperatura de 38,5 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, luego se lavaron y se dejaron por 3 h (periodo ventana) en el medio de mantenimiento post-ICSI a 38,5 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente fue tratado en 50 µl de Etanol al 7% durante 4 min a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó 1 vez en TALP-HEPES y tres veces en el medio de cultivo para ser cultivados, ver Anexo 18.

#### **3.5.4.4. 2 Ionomicina (2Io) / 6-dimetilaminopurina (6-DMAP)**

Los medios para la activación combinada de ionomicina y 6-DMAP fueron preparados según lo detallado por Tasripoo et al. (2012), ver Anexo 10, y la activación se procedió de acuerdo a Bevacqua et al. (2010), donde los ovocitos inyectados se colocaron en el medio de mantenimiento post-ICSI durante 30 min



en la incubadora a 38,5 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después, los ovocitos fueron incubados con 500 µl de ionomicina a 5 µM durante 5 minutos a una temperatura de 38,5 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, luego se lavaron y se dejaron por 3 h (periodo ventana) en el medio de mantenimiento a 38,5 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después se procedió a una segunda incubación con ionomicina en las mismas condiciones descritas, seguidamente se lavaron y se incubaron en 500 µl de 6-DMAP a 1,9 mM por 3 horas a 38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, se lavaron seis veces y se cultivaron en el medio de cultivo, ver Anexo 18.

#### **3.5.4.5. Cloruro de estroncio (SrCl<sub>2</sub>)**

La activación con SrCl<sub>2</sub> se hizo de acuerdo a los protocolos descritos por Kim et al. (2014) y Norozi-Hafshejani et al. (2018), ver Anexo 11 y 18. Los ovocitos inyectados se colocaron en el medio de mantenimiento post-ICSI durante 30 min en la incubadora a 38,5 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después, los ovocitos fueron incubados con 500 µl de SrCl<sub>2</sub> a 10 mM durante 3 h a una temperatura de 38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 90% de N<sub>2</sub>. Luego, se lavaron seis veces y se cultivaron en el medio de cultivo.

### **3.6. Cultivo *in vitro* de embriones**

Después de activar, los ovocitos activados y los no activados (ovocitos que estuvieron en el medio de mantenimiento post-ICSI durante 30 min a 38,5 °C y 5% de CO<sub>2</sub>) fueron colocados en placas 4-Well en 500 µl de medio de cultivo SOFaa (ver Anexo 12) equilibrado durante 2 h en la incubadora de CO<sub>2</sub>. Las placas 4-Well se colocaron dentro de una bolsa de polietileno y se llenó con mezcla de gases: 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 90% de N<sub>2</sub>, luego se selló y se dejó incubar a 38,5 °C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa, ver Anexo 19. La proporción de ovocitos clivados fue registrado en el día 2, mientras que el estadio de desarrollo y la calidad embrionaria fueron registrados en el día 5.

El efecto de los activadores químicos, se midió en función a las tasas de clivaje, estadio de desarrollo (mórula y blastocisto) y calidad embrionaria (excelente, bueno, regular y malo), para ello, se tomaron los criterios para la clasificación morfológica de los embriones de acuerdo con las pautas de la IETS (Stringfellow & Seidel, 1998; Bó & Mapletoft, 2018).

### **3.7. Diseño estadístico**

El tipo de investigación fue básica-experimental, con un Diseño Completamente al Azar (DCA). El experimento se repitió 4 veces por tratamiento. Los datos

porcentuales fueron sometidos a la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (Bartlett). Se utilizó análisis de varianza con la prueba de Duncan para observar la diferencia entre tratamientos. Datos que no cumplían con la normalidad y homogeneidad, fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis. Para todo los análisis, se consideró significativa una  $p < 0,05$ . Las pruebas fueron realizadas con el programa estadístico R 3.4.3.

El modelo estadístico utilizado para describir una observación fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ij}$ : observaciones (% clivaje, mórula, blastocisto, excelente, bueno, regular y malo)

$\mu$ : media poblacional

$T_i$ : efecto de los tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5 y T6)

$e_{ij}$ : error experimental.

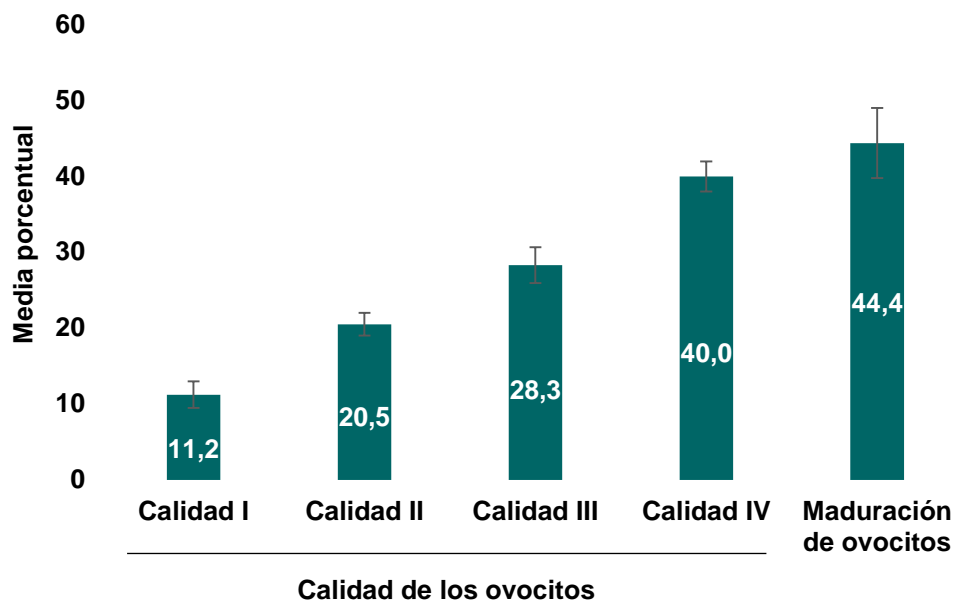
La cantidad de ovocitos por tratamiento no fue igual, porque se aplicaron criterios de exclusión en los ovocitos posterior a la inyección, tales como, la inyección de un espermatozoide, morfología homogénea y daño de la zona pelúcida, y la exclusión en la activación de los ovocitos (durante y posterior a la activación), tales como, ovocitos deformes y degenerados. Por tanto, se contó de 15 a 22 ovocitos por tratamiento, según los criterios mencionados.

#### **IV. RESULTADOS**

**Tabla 2.** Recuperación de los COCs de alpaca según la calidad ovocitaria y tasas de maduración de los ovocitos provenientes del Matadero Municipal de Huancavelica. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.

Repetición	Recuperación de ovocitos					Maduración de ovocitos (%)
	Ovocitos por ovario	Calidad de los COCs				
		Categ. I	Categ. II	Categ. III	Categ. IV	
1	5	11,60	18,23	28,18	41,99	43,09
2	6	13,59	21,20	25,54	39,67	44,02
3	4	10,00	21,33	31,33	37,33	50,67
4	6	9,77	21,26	28,16	40,80	39,66
<b>Media</b>	5	11,24	20,51	28,30	39,95	44,36
<b>SD</b>	0,83	1,76	1,52	2,37	1,98	4,61
<b>varianza</b>	0,7	3,1	2,3	5,6	3,9	21,2
<b>CV (%)</b>	16,1%	15,7%	7,4%	8,4%	5,0%	10,4%
<b>Mínimo</b>	3,9	9,8	18,2	25,5	37,3	39,66
<b>Máximo</b>	5,8	13,59	21,33	31,33	41,99	50,67

SD: Desviación estándar. CV: Coeficiente de variación. COCs: Complejos ovocito-cumulus. Categ.: Categoría



**Figura 4.** Media porcentual de la calidad y tasas de maduración de los ovocitos provenientes del Matadero Municipal de Huancavelica. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.

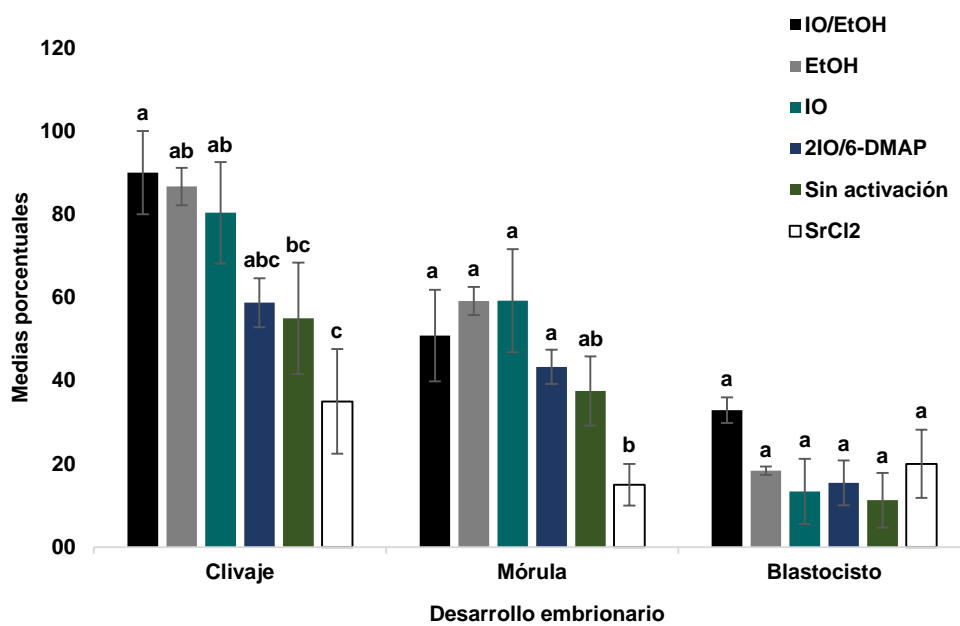
**Tabla 3.** Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre el porcentaje (media  $\pm$  EEM) del desarrollo de embriones *in vitro* de alpaca a las 120 horas (5 días) de cultivo. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.

Tratamiento	n	Desarrollo embrionario preimplantacional		
		(% media $\pm$ EEM)		
		Clivaje	Estadios embrionarios	
Mórula	Blastocisto			
Io	21	80,4 $\pm$ 12,2 <sup>ab</sup>	59,2 $\pm$ 12,4 <sup>a</sup>	13,4 $\pm$ 7,8 <sup>a</sup>
EtOH	22	86,7 $\pm$ 4,5 <sup>ab</sup>	59,2 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup>	18,3 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>
Io/EtOH	15	90,0 $\pm$ 10,0 <sup>a</sup>	50,8 $\pm$ 11,0 <sup>a</sup>	32,9 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>
2Io/6-DMAP	19	58,8 $\pm$ 5,9 <sup>abc</sup>	43,3 $\pm$ 4,1 <sup>a</sup>	15,4 $\pm$ 5,4 <sup>a</sup>
SrCl <sub>2</sub>	20	35,0 $\pm$ 12,6 <sup>c</sup>	15,0 $\pm$ 5,0 <sup>b</sup>	20,0 $\pm$ 8,2 <sup>a</sup>
Sin activación	18	55,0 $\pm$ 13,4 <sup>bc</sup>	37,5 $\pm$ 8,3 <sup>ab</sup>	11,3 $\pm$ 6,6 <sup>a</sup>

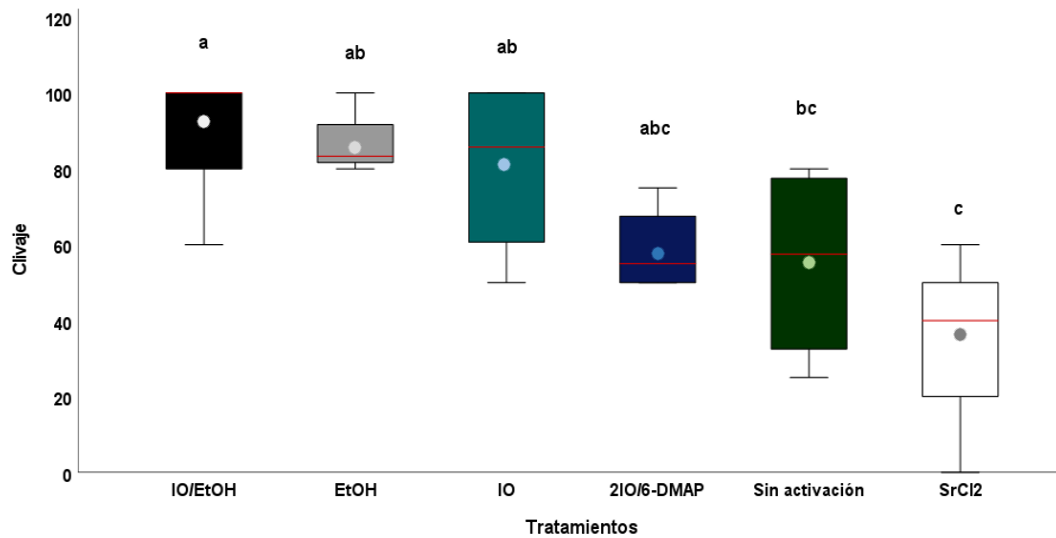
Io: Ionomicina, EtOH: Etanol, 6-DMAP: 6-Dimetilaminopurina, SrCl<sub>2</sub>: Cloruro de estroncio.

n: N° de ovocitos inyectados. EEM: Error estándar de la media.

<sup>a-c</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

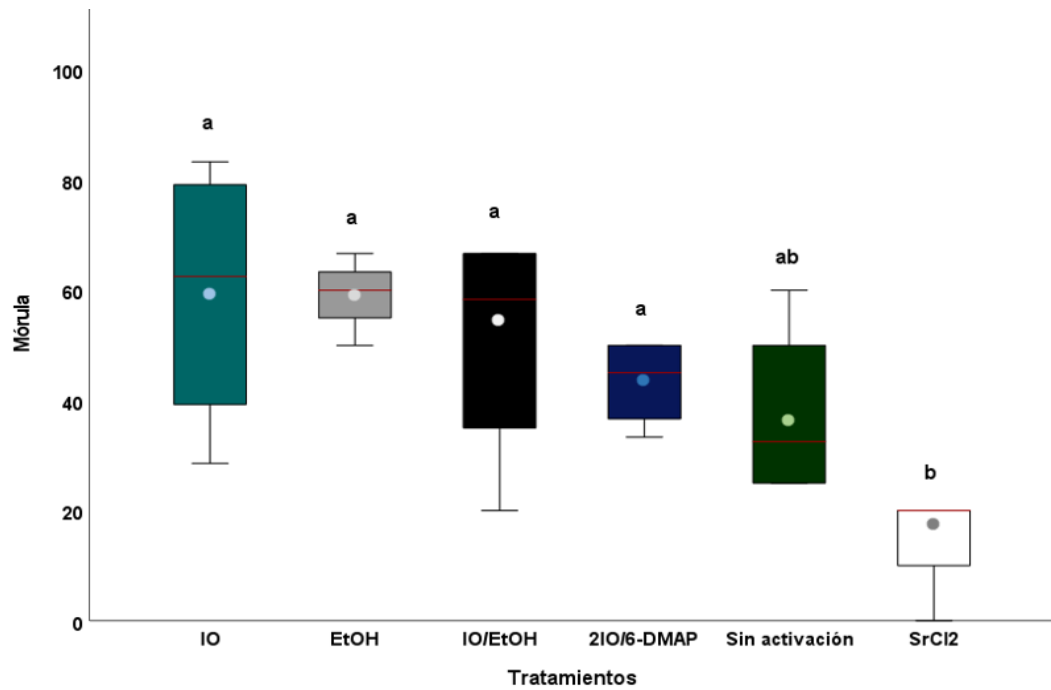


**Figura 5.** Desarrollo *in vitro* de embriones de alpaca con activación química post-ICSI a las 120 horas (5 días) de cultivo. Letras diferentes en las barras indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.

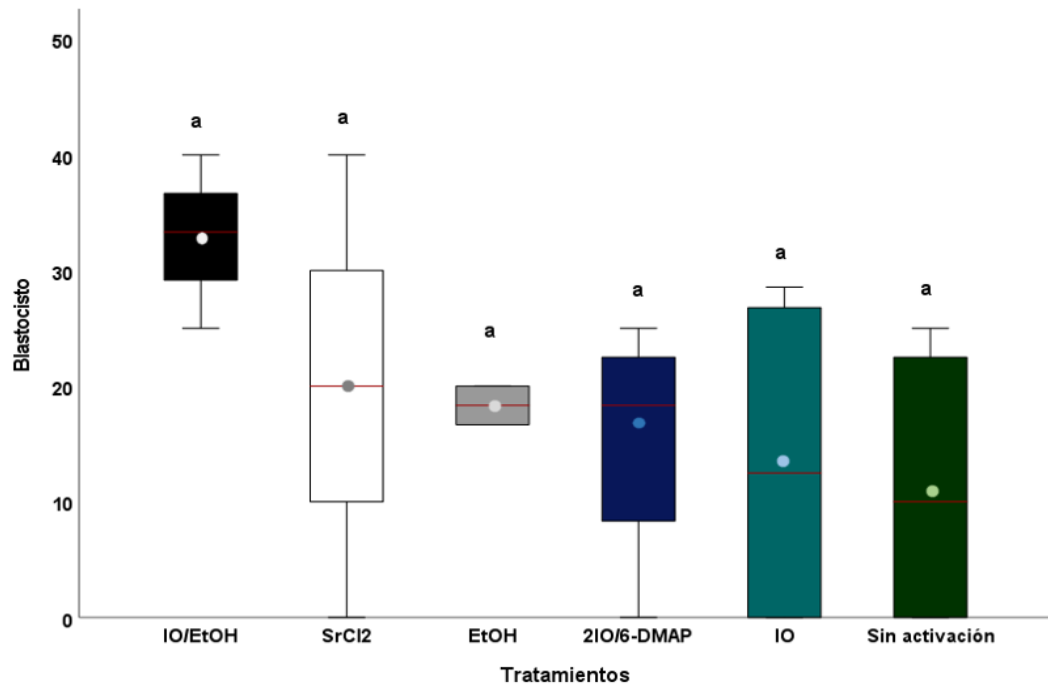


**Figura 6.** Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre el clivaje a las 48 h de cultivo. Letras diferentes en la parte superior de las cajas indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.

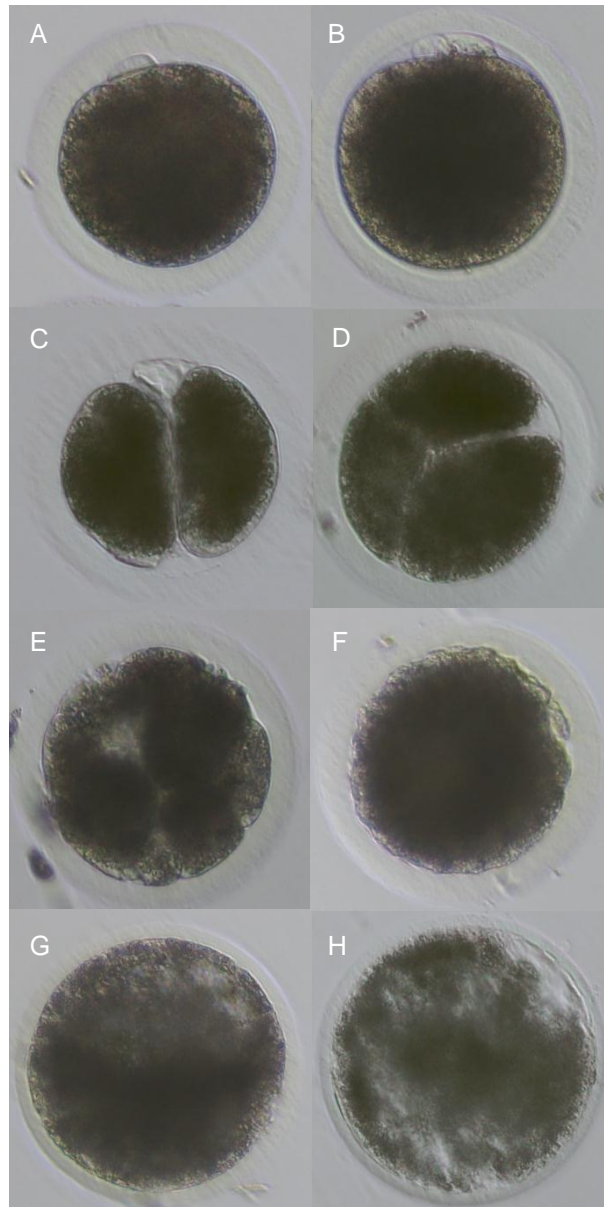




**Figura 7.** Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre el estadio de mórula a las 120 horas (5 días) de cultivo. Letras diferentes en la parte superior de las cajas indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.



**Figura 8.** Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre el estadio de blastocisto a las 120 horas (5 días) de cultivo. Letras diferentes en la parte superior de las cajas indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.



**Figura 9.** Embriones ICSI de alpaca, después de 5 días (120 h) de cultivo *in vitro*. (A) ovocito maduro (MII); (B) cigoto; (C) embrión de 2 blastómeros; (D) embrión de 4 blastómeros; (E) embrión en estadio de mórula temprana; (F) embrión en estadio de mórula compacta; (G-H) embriones en estadio de blastocisto. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.

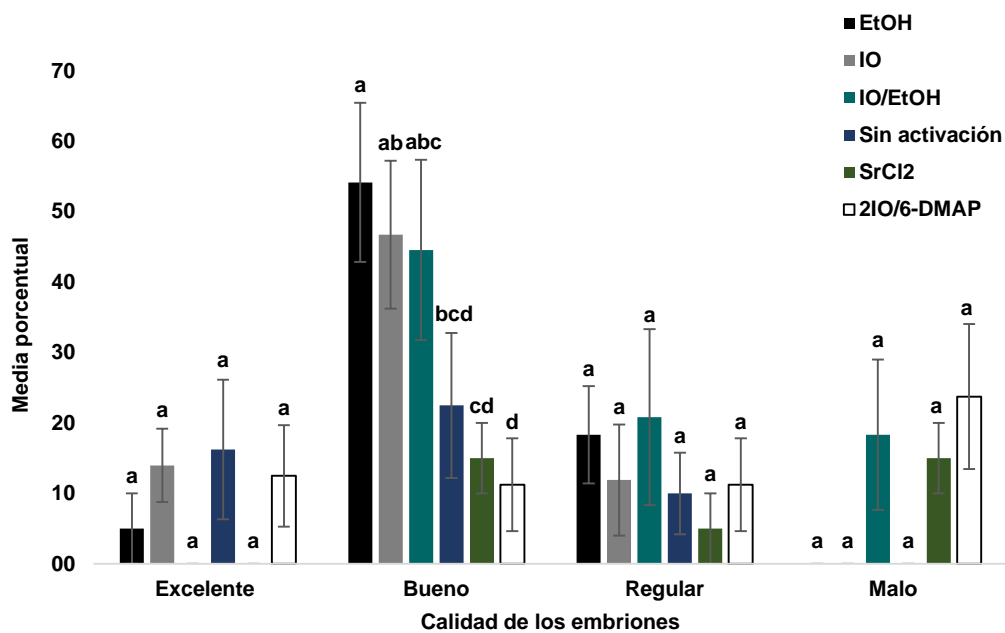
**Tabla 4.** Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre el porcentaje (media  $\pm$  EEM) de la calidad de los embriones (mórula y blastocisto) de alpaca a las 120 horas (5 días) de cultivo. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.

Tratamiento	n	Calidad de los embriones (% media $\pm$ EEM)			
		Excelente	Bueno	Regular	Malo
Io	21	14,0 $\pm$ 5,2 <sup>a</sup>	46,7 $\pm$ 10,5 <sup>ab</sup>	11,9 $\pm$ 7,9 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>
EtOH	22	5,0 $\pm$ 5,0 <sup>a</sup>	54,2 $\pm$ 11,3 <sup>a</sup>	18,3 $\pm$ 6,9 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>
Io/EtOH	15	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	44,6 $\pm$ 12,8 <sup>abc</sup>	20,8 $\pm$ 12,5 <sup>a</sup>	18,3 $\pm$ 10,7 <sup>a</sup>
2Io/6-DMAP	19	12,5 $\pm$ 7,2 <sup>a</sup>	11,3 $\pm$ 6,6 <sup>d</sup>	11,3 $\pm$ 6,6 <sup>a</sup>	23,8 $\pm$ 10,3 <sup>a</sup>
SrCl <sub>2</sub>	20	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	15,0 $\pm$ 5,0 <sup>cd</sup>	5,0 $\pm$ 5,0 <sup>a</sup>	15,0 $\pm$ 5,0 <sup>a</sup>
Sin activación	18	16,3 $\pm$ 9,9 <sup>a</sup>	22,5 $\pm$ 10,3 <sup>bcd</sup>	10,0 $\pm$ 5,8 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>

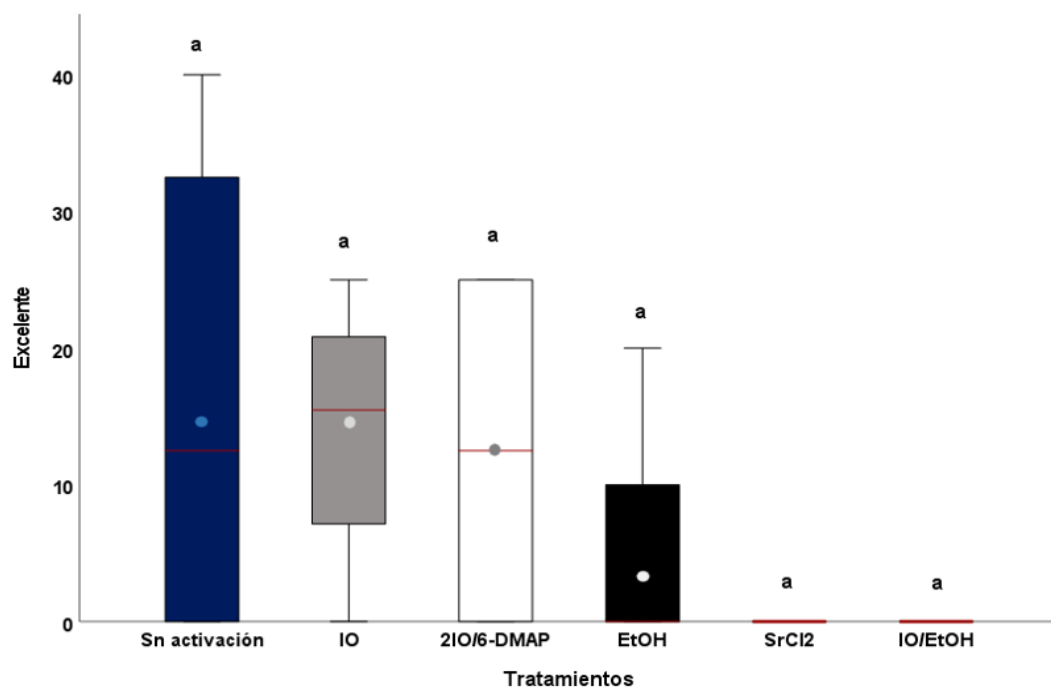
Io: Ionomicina, EtOH: Etanol, 6-DMAP: 6-Dimetilaminopurina, SrCl<sub>2</sub>: Cloruro de estroncio.

n: N° de ovocitos inyectados. EEM: Error estándar de la media.

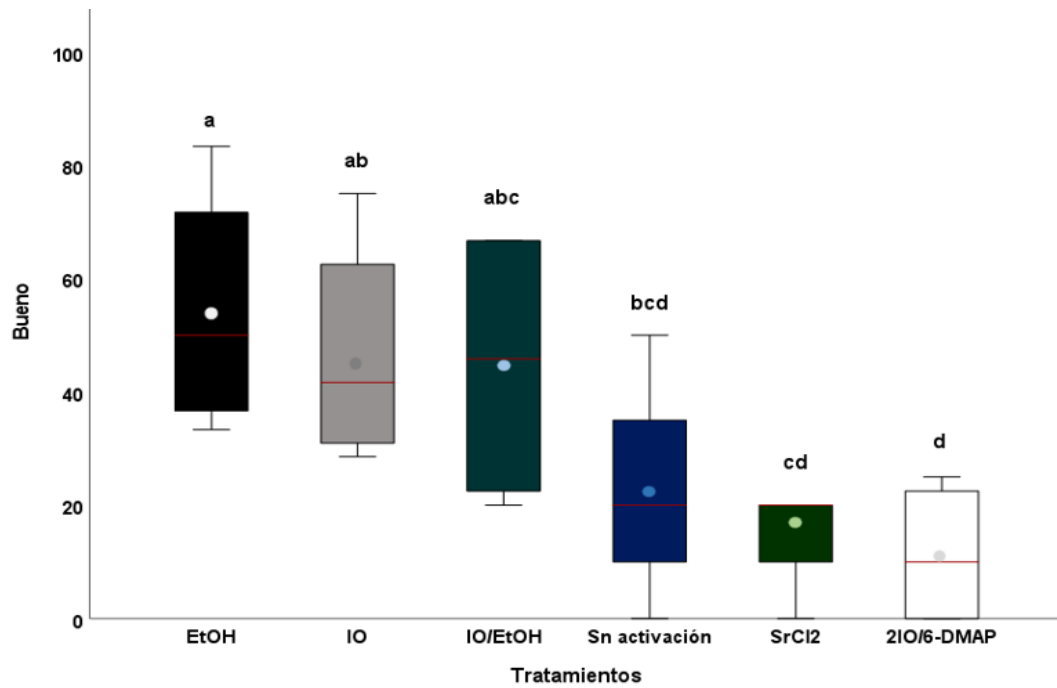
<sup>a-d</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).



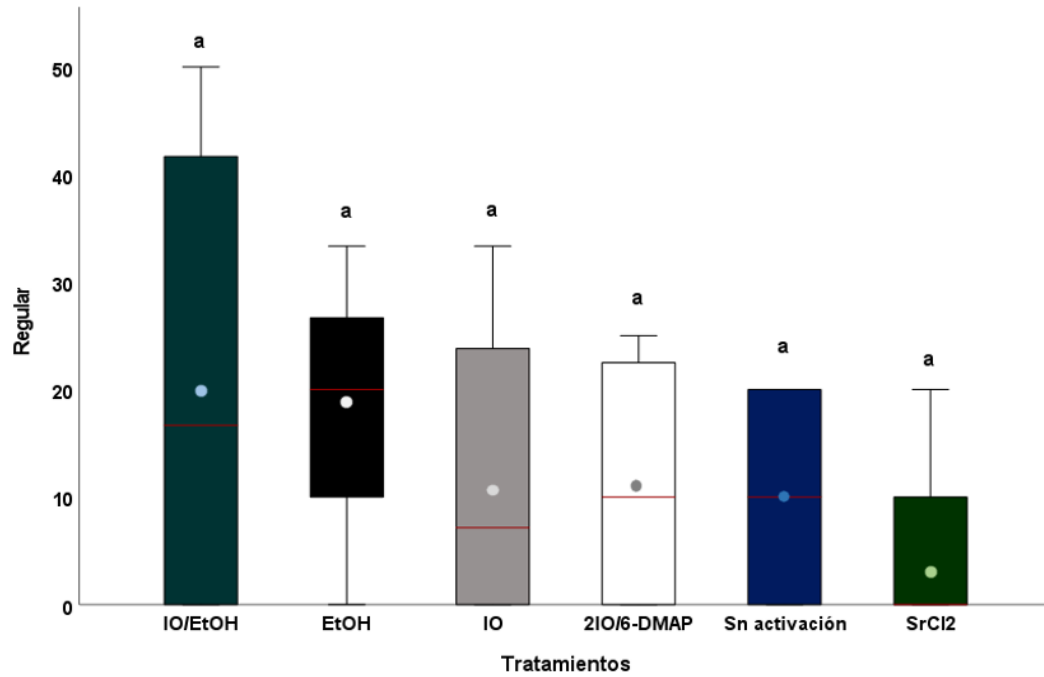
**Figura 10.** Calidad de los embriones (mórula y blastocisto) de alpaca con activación química post-ICSI a las 120 horas (5 días) de cultivo. Letras diferentes en las barras indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.



**Figura 11.** Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre la calidad excelente a las 120 horas (5 días) de cultivo. Letras diferentes en la parte superior de las cajas indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.

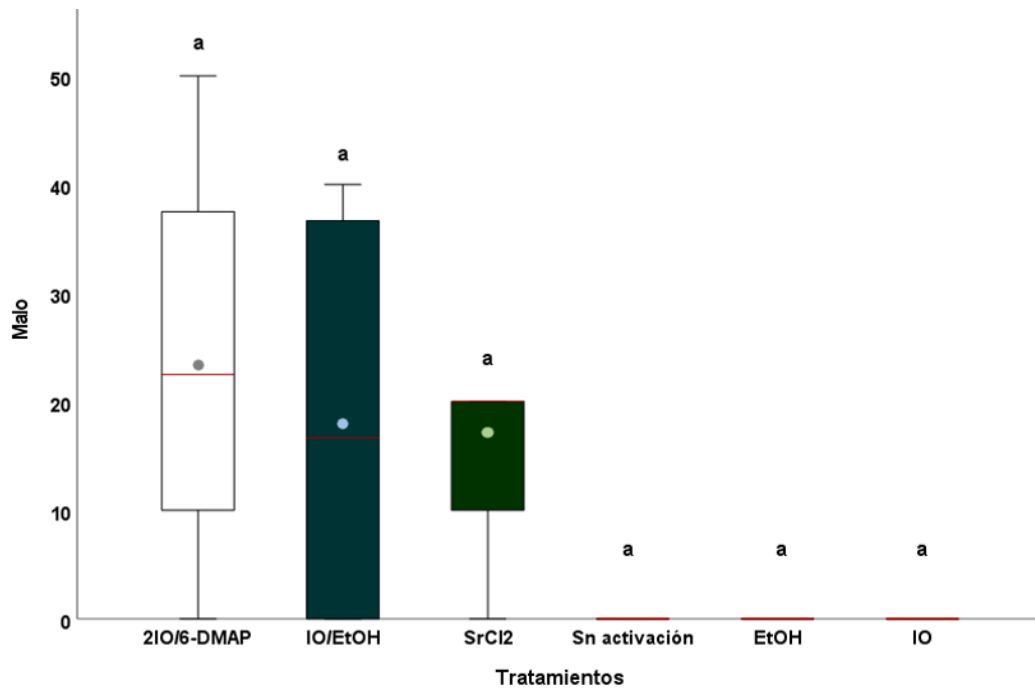


**Figura 12.** Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre la calidad buena a las 120 horas (5 días) de cultivo. Letras diferentes en la parte superior de las cajas indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.

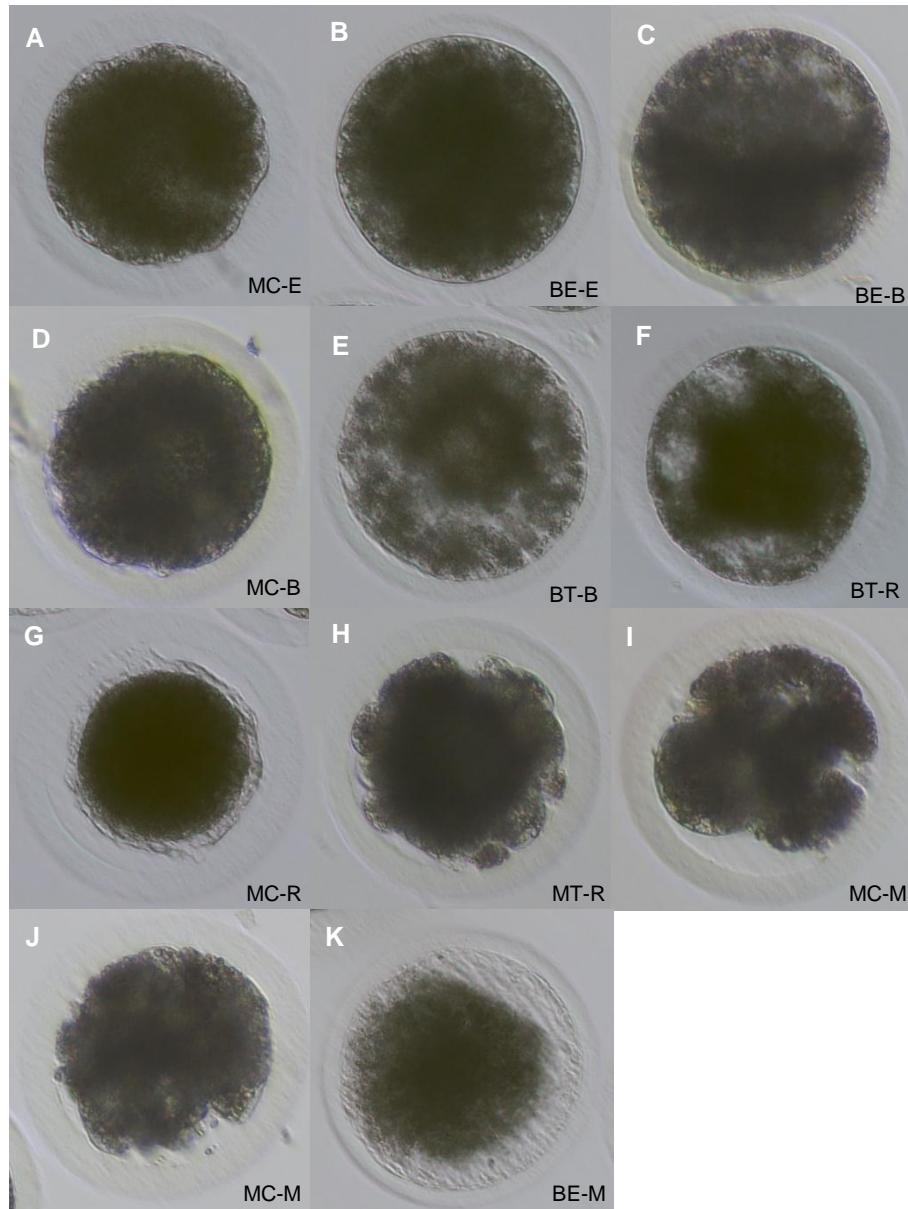


**Figura 13.** Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre la calidad regular a las 120 horas (5 días) de cultivo. Letras diferentes en la parte superior de las cajas indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.





**Figura 14.** Efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre la calidad mala a las 120 horas (5 días) de cultivo. Letras diferentes en la parte superior de las cajas indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.



**Figura 15.** Calidad de los embriones de alpaca, después de 5 días (120 h) de cultivo *in vitro*. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho. (A-B) excelente; (C-E) bueno; (F-H) regular; (I-K) malo. MT: mórula temprana; MC: mórula compacta; BT: blastocisto temprano; BE: blastocisto expandido.

## V. DISCUSIÓN

En la presente investigación se han producido *in vitro* embriones de alpaca, para ello se recuperaron los COCs de ovarios recolectados de animales *post mortem*, siendo estos madurados para luego ser fertilizados y finalmente cultivados hasta blastocisto. La maduración *in vitro* constituye uno de los primeros pasos en la producción *in vitro* de embriones, debido a que la continuidad de la fertilización de los ovocitos y el cultivo de embriones, depende en gran medida de los ovocitos maduros. En tal sentido, los COCs provenientes de ovarios de matadero fueron recuperados por *slicing*, obteniéndose 5 COCs/ovario, de los cuales fue de 11,24 %; 20,51 %; 28,3 % y 39,95 % para las categorías I, II, III y IV, respectivamente; los COCs de categoría I, II y III fueron madurados durante un periodo de 30 h, habiendo madurado (presencia del primero corpúsculo polar) el 51,4 % (Tabla 2, Figura 4). Todos los ovocitos maduros con un citoplasma homogéneo y oscuro fueron fecundados por ICSI, seguido de la activación con ionomicina (SC-263405, ChemCruz®), etanol (107017, sigma) y cloruro de estroncio (SrCl<sub>2</sub>, SC-258180, ChemCruz®) como tratamientos únicos y combinaciones con ionomicina y etanol, ionomicina y 6-DMAP (SC-203220, ChemCruz®), y finalmente se cultivaron por 48 h (clivaje) y 5 días (estadio y calidad de los embriones). Los resultados obtenidos como media porcentual en clivaje, fueron de 90,0 %; 86,7 %; 80,4 %; 58,8 %; 55,0 % y 35,5 % para los tratamientos con I/EtOH, EtOH, I, 2I/6-DMAP, control (sin activación) y SrCl<sub>2</sub>, respectivamente. Sin embargo, las medias no difirieron entre los tratamientos I/EtOH, EtOH, I y 2I/6-DMAP, así como los tratamientos 2I/6-DMAP, control y SrCl<sub>2</sub>; pero sí fueron superiores con I/EtOH, EtOH y I en comparación con SrCl<sub>2</sub> y control (Tabla 3, Figura 5). Así mismo, en la Figura 6, se muestra que existen diferencias significativas entre tratamientos. Por tanto, los activadores que aumentan los niveles de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y la 6-DMAP, permiten activar los ovocitos y obtener una mayor tasa de clivaje después de 48 h de cultivo *in vitro*.

Para el clivaje, en el grupo control, se obtuvo un porcentaje superior a lo reportado en llama con 29 % (Sansinena et al., 2007) y 7,4 % (Conde et al., 2008), en dromedario con 23 % (El-Sayed et al., 2015) y 34,7 % (Wani & Hong, 2018), en alpaca con 0,0 % (Castro-Modesto et al., 2022) y en bovino con 30 % para ovocito excelente, 12 % para ovocito bueno y 1 % para ovocito regular (Korkmaz et al., 2013). Al respecto, existen diversas etiologías asociadas a fallos en la activación de los ovocitos durante la ICSI. La activación de los ovocitos en la ICSI sugiere un mecanismo de dos etapas. La primera etapa, consiste en un pseudo desencadenamiento (*pseudotrigger*), que tiene lugar durante la inyección, donde se produce una entrada de  $Ca^{+2}$  proveniente del medio de inyección, siendo este incremento, similar al que se produce durante la fusión del espermatozoide con el ovocito en condiciones normales. La segunda etapa, se caracteriza por el patrón de oscilaciones de  $Ca^{+2}$ , resultante de la liberación en el citoplasma del ovocito del factor espermático, la PLC $\zeta$ . No se puede producir una correcta liberación de la PLC $\zeta$  si la primera etapa no ha producido el incremento de calcio adecuado (Tesarik & Mendoza, 1999). Por otro lado, la falla en la activación de los ovocitos puede deberse a una baja maduración citoplasmática por la poca acumulación del ion  $Ca^{2+}$  en el RE, así como un bajo número de mitocondrias presente en los ovocitos. Por tanto, parece ser que la activación mecánica por la inyección de los espermatozoides a los ovocitos en alpaca es suficiente para activar a los ovocitos debido a la entrada de  $Ca^{+2}$  al interior del ovocito, lo que ocasiona probablemente la inhibición del MPF. Cabe mencionar que el éxito de la ICSI depende mucho de la inyección del espermatozoide al ovocito, de la aspiración del citoplasma del ovocito (cuando se realiza la aspiración), tiempo de inyección (ICSI de 1-2 minutos por ovocito), concentración de PVP, posicionamiento del corpúsculo polar y el medio de inyección (para el primer incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ ). En nuestro caso, se utilizó PVP al 5 %, la posición del corpúsculo fue de 11-12 o 6-7 horas, la inyección fue realizada a las 3 o 9 en punto y en cuanto al medio de inyección fue en TL suplementado con 2 % de SFB y 0,2 mM de piruvato, lo que generó una mayor activación de los ovocitos de alpaca en comparación con los reportados por Castro-Modesto et al. (2022), que utilizaron Global Total con HEPES. Sin embargo, en la mayoría de ICSI se utilizan medios como el TALP-H (Moro et al., 2014), sp-TALP (Arias, 2013) y TCM-199 con HEPES (Cheng et al., 2012; Agnieszka et al., 2021) para la inyección de los espermatozoides que contienen en su composición de 1.8 a 2

mM de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , que aportan en el primer aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durante la inyección.

En cuanto a los activadores de transiciones únicas de  $\text{Ca}^{2+}$  (ionomicina y etanol), están por encima de los reportados en llama con 33 % para ionomicina (Sansinena et al., 2007), pero por debajo de los obtenidos en dromedario con 98,2 % para ovocitos vitrificados y 72,7 % en ovocitos sin vitrificar (Moulavi et al., 2021); y en estudios en bovinos, utilizando la A23187 se obtuvo un 32,7 % (Tasripoo et al., 2012) y 41,8 % en ovocito excelente, 19,8 % en ovocito bueno y 2 % en ovocito regular (Korkmaz et al., 2013). A pesar de que los ionóforos de calcio (ionomicina y A23187), inducen aumentos de calcio intracitoplasmático, pueden tener diferentes respuestas en la activación del ovocito, siendo superior la ionomicina en humanos (Nikiforaki et al., 2016) y en ovino la A23187 (Pichardo, 2017). Mientras que para el etanol, se obtuvo un porcentaje mayor que lo reportado para bovino con 47 %, para ovocitos excelentes, 16 % para ovocitos buenos y 5,2 % para ovocitos regulares (Korkmaz et al., 2013); en ovino con 54 % (Pichardo, 2017), siendo el etanol superior que la ionomicina y A23187, que resultaron un 42 % y 47 %, respectivamente. En cuanto a los activadores de dos transiciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (ionomicina/etanol), los resultados están por encima de los reportados en bovinos con 12 % (Arias, 2013; Arias et al., 2015) y 64,7 % (Bevacqua et al., 2010); ocurriendo lo mismo con la doble activación con ionomicina (2lo) con 60 % (Bevacqua et al., 2010) o triple y cuádruple activación en piezo-ICSI (2lo/EtOH y 3lo/EtOH) con 71,7 % y 78,8 %, respetivamente (Lee et al., 2015). Cabe mencionar que durante la fertilización en los mamíferos, el patrón de  $\text{Ca}^{2+}$  consiste en transiciones repetidas en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  u oscilaciones  $\text{Ca}^{2+}$ , que duran varias horas, y durante las horas de oscilación se encontraron que diferentes eventos de activación de ovocitos requieren diferentes números de oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ducibella et al., 2002). Por lo tanto, un solo pulso de  $\text{Ca}^{2+}$  es suficiente para iniciar la excitosis de los CGs, mientras que la reanudación meiótica y la formación de pronúcleos requieren al menos cuatro y ocho pulsos de aumentos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , respectivamente. Sin embargo, otra evidencia demuestra que si la entrada de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  alcanza un cierto umbral, independientemente del número de transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$ , esto sería suficiente para inducir tanto la activación de los ovocitos como el desarrollo embrionario preimplantacional y posterior al implante (Toth et al., 2006; Ducibella et al., 2002). Por lo tanto, es probable que,

en alpaca, sea necesario aumentar 3 veces la concentración de calcio para alcanzar el umbral y así ocurran todos los eventos involucrados en la activación, tanto los eventos tempranos y tardíos, mientras que para el bovino se requiere aumentar al menos 4 a 5 veces la  $[Ca^{2+}]_i$  para obtener mayores tasas en la activación de los ovocitos y en el clivaje (Lee et al., 2015). Adicionalmente, en experimentos realizados en nuestro laboratorio, se ha observado que, en partenogénesis con etanol, se requieren al menos 3 aumentos de calcio (datos no mostrados) para obtener mayores tasas en clivaje. Sin embargo, los métodos de AOA con ionomicina, A23187 y etanol pueden tener mayor éxito en una especie, pero no en otra, por lo que se ven diferentes efectos en la activación de los ovocitos y por lo tanto tener mayores porcentajes en el clivaje (Korkmaz et al., 2013; Nikiforaki et al., 2016; Pichardo, 2017), por lo que es necesario probar la A23187 en la alpaca.

En cuanto al tratamiento de inhibición de la fosforilación de proteínas (2I<sub>0</sub>/6-DMAP), fueron inferiores que los reportados en bovinos con 82,7 % (Bevacqua et al., 2010); 86 % (Arias, 2013; Arias et al., 2015) y 81,2 % (Arias et al., 2016); y para la activación con un solo tratamiento de ionomicina (I<sub>0</sub>/6-DMAP) en llama con 63% (Sansinena et al., 2007); en bovinos con 71,2 % (Bevacqua et al., 2010); 76,7 % A/buena, 73,3 % B/buena, 71,4 % A/mala y 65,6 % B/mala, siendo espermatozoides de toro A y B y ovocitos de buena y mala calidad (Ohlweiler et al., 2013). Mientras que los reportados en llama por Conde et al. (2008), están por debajo con 36%, y alpaca con 43,75 % (Castro-Modesto et al., 2022). Parece ser que, en alpaca, el MFP-CDK1 es más susceptible a ser inactivado por el aumento de calcio en el citoplasma del ovocito y como consecuencia se observan mayores tasas en la activación, como se menciona en la presente investigación, en comparación con el bovino que requiere mayor número de tratamientos que aumenten la  $[Ca^{2+}]_i$ , en tal sentido, sería necesario un menor tiempo en la exposición con el 6-DMAP para que actúe sobre la CDK1 e inhibir la acción del MFP. Más aun, los protocolos de activación con el 6-DMAP tienen una duración de 3 a 4 h en bovino, por la necesidad de inhibir en mayor tiempo al CDK1 para salir del arresto de la meiosis II, sin embargo, aún no se ha determinado el tiempo idóneo en la activación con el 6-DMAP en alpaca, ya que probablemente se requiera un menor tiempo, siendo necesario demostrar dicha suposición, además, una exposición de menor tiempo resultaría en menores daños al ovocito. Por otro lado, los ovocitos de alpaca, parecen estar más

afectados durante la exposición con este reactivo ya que probablemente hay mayores tasas en la fertilización anormal, que se ven reflejadas en las bajas tasas de clivaje, pues se sabe que el 6-DMAP es un inhibidor global de las proteínas quinasas y muchas de las quinasas están involucradas en los procesos celulares y pueden ejercer efectos letales en los eventos celulares después de la activación.

En cuanto al  $\text{SrCl}_2$  que induce oscilaciones de calcio, se obtuvo un 35,5 % en clivaje, las que resultaron ser inferiores a los reportados en humano con 95,5 % en clivaje (Kim et al., 2014); 51,2 % y 49,7 % en activación de ovocitos y fecundación, respectivamente (Norozzi-Hafshejani et al., 2018) y 97 % clivaje/ovocitos fertilizados (Fawzy et al., 2018); mientras que, en bovino con la ionomicina y cloruro de estroncio ( $\text{Io/SrCl}_2$ ), se obtuvieron un 63,8 % en clivaje (Bevacqua et al., 2010). Se sabe que en mamíferos, los pequeños cambios en la naturaleza oscilatoria de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , pueden tener un impacto negativo tanto en la activación de los ovocitos como en la expresión génica y tener efectos a largo plazo, como un desarrollo embrionario reducido tanto en el desarrollo preimplantacional y posterior al implante (Ozil et al., 2006; Ozil & Huneau, 2001; Ajduk et al., 2011). Parece ser que, la oscilación en alpaca, puede ejercer efectos en otros eventos de la activación ya que solo se requiere de 2 a 3 aumentos de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  para tener mayores éxitos, como se demuestra en este trabajo; sin embargo, en ovocito humano el  $\text{SrCl}_2$  aumenta las tasas en la fertilización, clivaje y blastocisto en comparación del grupo sin AOA y con AOA-A23187 (Kim et al., 2014; Fawzy et al., 2018); mientras que en bovino con un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  seguido del tratamiento con  $\text{SrCl}_2$ , son bajas en clivaje en comparación con los otros tratamientos como el doble aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y 6-DMAP ( $2\text{Io}/6\text{-DMAP}$ ), al igual que en alpaca. Cabe mencionar que en bovino y en la presente investigación, los ovocitos fueron incubados durante 3 h en  $\text{SrCl}_2$  y en humanos de 1 h, por lo que, podría ser que una incubación prolongada altere los eventos de la activación tras la ICSI, dando las tasas bajas en el clivaje, ya que aún no se ha determinado el tiempo adecuado para la alpaca, así como tampoco cuántos picos de calcio son necesarios para desencadenar todos los procesos de la activación.

En la Tabla 3 y Figura 5, se muestra la media porcentual de los estadios del desarrollo embrionario preimplantacional (Figura 9), donde se obtuvo, para mórula y blastocisto, porcentajes de 59,2 %; 59,2 %; 50,8%; 43,3%; 37,5 %; 15,0

% y 18,3 %; 13,4 %; 32,9 %; 15,4 %; 11,3 %; 20,0 % para los tratamientos EtOH, lo, lo/EtOH, 2lo/6-DMAP, control (sin activación) y SrCl<sub>2</sub>, respectivamente. En las medias para las mórulas no difirieron en los tratamientos de EtOH, lo, lo/EtOH, 2lo/6-DMAP y control, así como en el control y el SrCl<sub>2</sub>, pero sí fueron superiores con EtOH, lo, lo/EtOH y 2lo/6-DMAP en comparación con SrCl<sub>2</sub>; mientras que, para los estadios de blastocisto no difirieron entre los tratamientos. Así mismo, en la Figura 7 y 8, se muestra que existen diferencias entre tratamientos en mórula, mientras que en blastocisto no se encontraron diferencias. Por tanto, los tratamientos que inducen uno o dos aumentos de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, permiten obtener porcentajes mayores al 50 % en las tasas en mórula, después de 5 días de cultivo *in vitro*, y en blastocisto pueden ser comparables.

Las tasas de mórula y blastocisto para el grupo control, están por encima de los reportados en dromedario con 24,0 % para mórula y 6,7 % en blastocisto (Wani & Hong, 2018) y 5,5 % en blastocisto (El-Sayed et al., 2015); en alpaca 0,0 %, tanto mórula y blastocisto (Castro-Modesto et al., 2022); en llama con 3,7 % en blastocisto (Conde et al., 2008). Mientras que, para los tratamientos que inducen de uno o dos aumentos de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (A23187, EtOH, lo y lo/EtOH), se ha reportado utilizando ionomicina en dromedario un 80,1 %; 7,7 %; y 11,1 % para mórula, blastocisto y blastocisto eclosionado, respectivamente, para ovocitos vitrificados, y con 72,9 %; 28,1 % y 52,4 % para mórula, blastocisto y blastocisto eclosionado, respectivamente, para los ovocitos no vitrificados (Moulavi et al., 2021); en bovino con A23187, se obtuvo 4,7 % en mórula y 1,9 % en blastocisto (Tasripoo et al., 2012); 11% y 4 % para ovocitos de calidad excelente y para la calidad buena 4,4 % y 2,15 % para mórula y blastocisto, respectivamente (Korkmaz et al., 2013); y 11,21 % para mórula, 7,47 % para mórula compacta y 4,84 % para blastocisto (Habsah et al., 2016); en caprino con 16,31 % en blastocisto (Kharche et al., 2016); y con EtOH en bovino, 32 % y 23 % para ovocito excelente 8,5 % y 3,8 % para ovocito bueno, en mórula y blastocisto, respectivamente, (Korkmaz et al., 2013); y con lo/EtOH, en bovino con 4 % en blastocisto (Arias, 2013); 4 % en blastocisto (Arias et al., 2015); y para los tratamientos con más de dos aumentos de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> con 19,6 % y 18,3 % en blastocisto de bovino con 2lo/EtOH y 3lo/EtOH, respectivamente (Lee et al., 2015). En cuanto al grupo 2lo/6-DMAP, en llama se reportaron con el tratamiento lo/6-DMAP un 16 % en blastocisto (Conde et al., 2008); y 0,0 % en mórula y blastocisto con el medio CR1aa, y 25 % y 12 % mórula y blastocisto,



respectivamente, con el medio Llama OEC-co-culture, (Sansinena et al., 2007); en alpaca con 12,5 % en mórula (Castro-Modesto et al., 2022); mientras que en bovino con 2 aumentos de calcio seguido de 6-DMAP (2I<sub>o</sub>/6-DMAP), se reportó 41 % para blastocisto (Arias, 2013); 45,5 % para blastocisto temprano, 25 % para blastocisto expandido y 29,5 % blastocisto eclosionado (Arias et al., 2016); 41 % en blastocisto (Arias et al., 2015); y con un aumento de calcio seguido de 6-DMAP (I<sub>o</sub>/6-DMAP), 28,3 % para ovocito bueno y 22,4 % para ovocito malo en blastocisto (Ohlweiler et al., 2013); 30,91 % y 14% en blastocisto para ovocito excelente y bueno, respectivamente (Korkmaz et al., 2013); 47,7 %, 34,6 % y 13% para mórula, blastocisto y blastocisto protruido, respectivamente, con A23187/6-DMAP (Tasripoo et al., 2012). Para el SrCl<sub>2</sub>, en humanos se han reportado 62 % en blastocisto/ovocito fertilizados (Fawzy et al., 2018); 25,7 % en blastocisto (Kim et al., 2014); en bovino con I<sub>o</sub>/SrCl<sub>2</sub> 13,4 % para mórula y 10,9 % para blastocisto (Bevacqua et al., 2010).

Existen diferentes reportes en los CSA en cuanto a porcentajes de estadios de mórula y blastocisto y esto podría explicarse porque en los CSA hace mucha falta realizar investigación básica en los diferentes tópicos que involucra la producción *in vitro* de embriones, entre ellos, formulación de medios, en comparación de otras especies como el bovino, lo cual posiblemente sea parte de la explicación de los resultados encontrados en el presente estudio, siendo mejor en un medio y peor en otro (Sansinena et al., 2007). El medio de cultivo utilizado se muestra en el Anexo 12, y a comparar, presenta más suplementos que el utilizado por Castro-Modesto et al. (2022), que estaba constituido por KSOM suplementado con 10% SFB, 2 mM Piruvato de sodio y 50 µg/ml de gentamicina, lo cual podría explicar sus resultados y donde no reportan blastocisto. Además, en otras especies se han utilizado diferentes medios de cultivo en embriones ICSI, los que no muestran mucha variación marcada como en CSA, como el TCM-199 (Wani & Hong, 2018), SOF (Bevacqua et al., 2010), SOFm (El-Sayed et al., 2015; Moulavi et al., 2021), SOFaa (Tasripoo et al., 2012), SOFaaci (Lee et al., 2015; Ohlweiler et al., 2013), KSOM (Arias Cea, 2013; Arias et al., 2015), KSOMaa (Arias et al., 2016), RVCL (Kharche et al., 2016), CR1aa (Korkmaz et al., 2013; Habsah et al., 2016); y en CSA, se han utilizado en llama el SOFm (Conde et al., 2008), CR1aa y Llama OEC-co-culture (Sansinena et al., 2007) y Alpaca KSOM (Castro-Modesto et al., 2022), los que resultaron en bajas tasas de desarrollo embrionario. Adicionalmente, en

experimentos realizados en nuestro laboratorio, se ha observado que, en la PIV de embriones con FIV convencional, utilizando el medio de cultivo comercial Stroebech vs SOFaa (ver Anexo 12), sería mejor el Stroebech para obtener mayores tasas en el desarrollo embrionario, así como en la calidad de los embriones (datos no mostrados). Por otro lado, el aumento de uno o dos de la  $[Ca^{2+}]_i$  son suficientes para activar a los ovocitos de alpaca sin alterar los eventos de la activación de los ovocitos que son perjudiciales en los eventos tardíos como la activación del genoma del cigoto y el desarrollo embrionario preimplantacional. Sin duda, la 6-DMAP con dos aumentos de la  $[Ca^{2+}]_i$  son beneficiosos en bovinos en cuanto a las tasas en mórula y blastocisto a comparación de solo la activación de uno a dos aumentos de la  $[Ca^{2+}]_i$ , sin embargo, en las alpacas no hay mucha diferencia en cuanto a las tasas de mórula y blastocisto por activar un mayor número de ovocito-ICSI con uno a dos aumentos de la  $[Ca^{2+}]_i$ , caso que no ocurre en bovinos. Por lo tanto, el modo de la inyección del espermatozoide, los protocolos de activación y la formulación del medio del cultivo, juegan un rol muy importante en el éxito de la PIV de embriones ICSI.

Se han establecido diferentes sistemas de evaluación para establecer la calidad de los embriones, y el método convencional de la evaluación de embriones se basa en la evaluación de parámetros morfológicos; sin embargo, la evaluación del número total de células, distribución del TE, MCI y proporción MCI/células totales, son frecuentemente utilizados para evaluar la calidad de blastocisto producidos *in vitro* por ICSI o clonación. En la ICSI, a veces los ovocitos pueden resultar en una fertilización anormal (3PN o 1PN), generalmente la formación de 1PN después de la ICSI se debe a la activación partenogenética, la fusión prematura de PN materna y paterna (Balakier, 1993), y a la asincronía en la formación de los PN en el momento de la evaluación (Munné et al., 1993), y la formación de 3PN está relacionada con la falta de extrusión del segundo cuerpo polar (Reichman et al., 2010), en mucho de los casos puede aumentar por la presión hidrostática ejercida durante el procedimiento ICSI, lo que alteraría los microtúbulos del huso del ovocito (Macas et al., 1996). Por otro lado, una fertilización anormal es generalmente descartada debido al alto riesgo de defectos cromosómicos y pueden tener un potencial de desarrollo reducido (Giritharan et al., 2010), así como una muerte embrionaria y baja calidad, sin embargo, pueden llegar a escindirse y alguno de ellos incluso pueden

convertirse en blastocisto. Cabe mencionar que no se encontró reportes en la producción *in vitro* de embriones por ICSI sobre la clasificación según la calidad con los parámetros morfológicos en CSA, en tal sentido, nuestro resultado constituye el primer reporte.

En la Tabla 4 y Figura 10, se muestra la media porcentual de las calidades de los embriones (Figura 15), en la que se obtuvo en calidad “excelente”: 5,0 %; 14,0 %; 0,0 %; 16,3 %; 0,0 % y 12,5 %; “bueno”: 54,2 %; 46,7 %; 44,6 %; 22,5 %; 15,0 % y 11,3 %; “regular”: 18,3 %; 11,9 %; 20,8 %; 10,0 %; 5,0 % y 11,3 %; “malo”: 0,0 %; 0,0 %; 18,3 %; 0,0 %; 15,0 %; 23,8 % para los tratamientos de EtOH, lo, lo/EtOH, control, SrCl<sub>2</sub> y 2lo/6-DMAP, respectivamente. En la calidad “bueno” hay diferencias entre tratamientos, siendo superior el EtOH, lo y lo/EtOH, en comparación con la 2lo/6-DMAP, SrCl<sub>2</sub> y control, sin embargo, no hay diferencias estadísticas en la calidad “excelente”, “regular” y “malo”. Así mismo, en la Figura 11, 12, 13 y 14, se muestra que existen diferencias entre tratamientos en la calidad “buena”, mientras que en la calidad “excelente”, “regular” y “malo” no se encontraron diferencias. Por tanto, los tratamientos con aumentos de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> permite obtener la mayor tasa en la calidad “bueno” después de 5 días de cultivo *in vitro*, y en “excelente”, “regular” y “malo” pueden ser comparables.

En un estudio realizado por Lee et al. (2015) en bovino, se menciona que, la frecuencia de estímulos iónicos de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> de dos a cuatro veces con A23187/EtOH, lo/EtOH, 2lo/EtOH y 3lo/EtOH no incrementa el porcentaje de embriones normalmente fecundados por ICSI, obteniéndose 72,7 %; 75,0 %; 77,0 %; 76,5 %, respectivamente, y con número de células por blastocisto de 144,6 y 95,6 para 3lo/EtOH y 2lo/EtOH, respectivamente. Los datos obtenidos por Lee et al. (2015) son comparables con los de Bevacqua et al. (2010), donde obtuvieron para fertilización normal 73,9 %; 55,0 % para lo/EtOH y 2lo; y para el número de células por blastocisto, con 69,2% y 70,0%, respectivamente. Por tanto, parece ser que, en alpaca, no existe una tasa elevada de anormalidades en la fertilización al aumentar la concentración de calcio intracitoplasmático de los ovocitos tras la ICSI con los activadores de un aumento y de dos aumentos de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, por lo que resultaron mejor los embriones en la calidad “buena”; sin embargo, es necesario evaluar el número de pronúcleos para determinar la fertilización normal (2PN) y el número de células por blastocisto para ver la calidad embrionaria para los tratamientos EtOH, lo y lo/EtOH.

Mientras que, en bovino, con 6-DMAP, puede ser bajo en la fertilización normal dando para 1o/6-DMAP con 50,0 % en comparación con los activadores ionomicina y etanol, pero pueden ser comparables con la doble activación de ionomicina (2lo/6-DMAP) que resulta 76,9 %. Esto sugiere que el segundo tratamiento con ionomicina disminuye el desarrollo anormal de los pronúcleos, y como consecuencia, las tasas de embriones en blastocisto aumenta de 18,7% a 25,9 % y el número de células por blastocisto de 68,33 a 91,5 para 1o/6-DMAP y 2lo/6-DMAP, respectivamente (Bevacqua et al., 2010). Por otro lado, la 6-DMAP interfiere en muchas quinasas, en muchos de los casos estas quinasas están involucradas en procesos celulares, cuyo efecto puede ser letal en los subsecuentes eventos celulares después de la activación (Susko-Parrish et al., 1994). Además, este compuesto causa daños en el ADN, reflejados en el patrón anormal de cariocinesis en el primer ciclo celular. También se ha documentado que con 6-DMAP podría saltarse la etapa de metafase y reiniciar la fase S de la división en algunos núcleos, causando anomalías cromosómicas como mixoploidía, poliploidía, cuerpos cigotos anormales y prevenir la extrusión del segundo corpúsculo polar (Oikawa et al., 2005). Por tanto, parece ser que, en alpaca, el tratamiento con 6-DMAP, puede inducir mayores daños en los ovocitos, siendo más propensos en comparación al bovino (Arias, 2013; Bevacqua et al., 2010; Arias et al., 2016). Por otro lado, Bevacqua et al. (2010), reporta que el doble tratamiento con ionomicina antes de someterlos a 6-DMAP, disminuye la fertilización anormal y mejora la calidad embrionaria en el número de células por blastocisto, por lo que, en la presente investigación se sometió a un tratamiento doble con ionomicina, seguido de 6-DMAP, dando como resultado en calidad embrionaria “buena” un bajo porcentaje con 11,3 % y un alto porcentaje en calidad “mala” de 23,8 %, por lo que estos resultados podrían indicar que los ovocitos ICSI tratados con 6-DMAP, presentan altas tasas de fertilización anormal con 3PN a causa de la falta de extrusión del segundo corpúsculo polar, ya que aún no se ha determinado el periodo ventana para la extrusión del cuerpo polar para esta especie, antes del tratamiento con 6-DMAP; más aún, algunos ovocitos tienen un retraso en su activación, específicamente en la extrusión del corpúsculo polar, siendo más marcado en la nula liberación del segundo corpúsculo polar por la 6-DMAP. Sin embargo, es necesario evaluar el número de pronúcleos para determinar la fertilización normal, la cariocinesis para ver la ploidía de los embriones y el número de células por blastocisto para ver la calidad embrionaria..

## **VI. CONCLUSIONES**

1. Los activadores químicos post-ICSI evaluados tuvieron un efecto variado, tanto en los estadios del desarrollo embrionario temprano como en la calidad de los embriones de alpaca.
2. La mayor tasa de clivaje y estadio de mórula se obtuvieron en los tratamientos con ionomicina más etanol, etanol, ionomicina y doble tratamiento con ionomicina más 6-DMAP, en comparación al tratamiento con cloruro de estroncio y grupo control (sin activación).
3. El mayor porcentaje de embriones de calidad “bueno”, se obtuvo en los tratamientos con etanol, ionomicina e ionomicina más etanol, en comparación al doble tratamiento con ionomicina más 6-DMAP, cloruro de estroncio y grupo control (sin activación).

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Seguir con las investigaciones referentes a la activación de ovocitos post-ICSI utilizando activadores químicos más específicos para inhibir el MPF, así como pulsos eléctricos y combinaciones.
2. Realizar investigaciones en el pre-tratamiento de los espermatozoides antes de la ICSI con la finalidad de aumentar la proporción de ovocitos fecundados y el potencial de desarrollo embrionario.
3. Investigar medios secuenciales en el CIV para aumentar la proporción de embriones en el estadio de blastocisto.
4. Reemplazar la PVP por el hialuronano para la inmovilización de los espermatozoides.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdoon, A. S. S. (2001). Factors affecting follicular population, oocyte yield and quality in camels (*Camelus dromedarius*) ovary with special reference to maturation time *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, 66(1-2), 71-79.
- Agnieszka, N., Joanna, K., Wojciech, W., & Adam, O. (2021). *In vitro* maturation of equine oocytes followed by two vitrification protocols and subjected to either intracytoplasmic sperm injection (ICSI) or parthenogenic activation. *Theriogenology*, 162, 42-48.
- Aitken, R. J., & Nixon, B. (2013). Sperm capacitation: A distant landscape glimpsed but unexplored. *Molecular human reproduction*, 19(12), 785-793.
- Ajduk, A., Ilozue, T., Windsor, S., Yu, Y., Seres, K. B., Bompfrey, R. J., Tom, B. D., Swann, K., Thomas, A., & Graham, C. (2011). Rhythmic actomyosin-driven contractions induced by sperm entry predict mammalian embryo viability. *Nature communications*, 2(1), 1-10.
- Ajduk, A., Yamauchi, Y., & Ward, M. A. (2006). Sperm chromatin remodeling after intracytoplasmic sperm injection differs from that of *in vitro* fertilization. *Biology of reproduction*, 75(3), 442-451.
- Albarracín, J. L., Morató, R., Izquierdo, D., & Mogas, T. (2005). Effects of roscovitine on the nuclear and cytoskeletal components of calf oocytes and their subsequent development. *Theriogenology*, 64(8), 1740-1755.
- Alexandre, H., Delsinne, V., & Goval, J.-J. (2003). The thiol reagent, thimerosal, irreversibly inhibits meiosis reinitiation in mouse oocyte when applied during a very early and narrow temporal window: A pharmacological analysis. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 65(4), 454-461.
- Amdani, S. N., Yeste, M., Jones, C., & Coward, K. (2016). Phospholipase C zeta (PLC $\zeta$ ) and male infertility: Clinical update and topical developments. *Advances in biological regulation*, 61, 58-67.
- Anifandis, G., Dafopoulos, K., Messini, C. I., Chalvatzas, N., & Messinis, I. E. (2010). Effect of the position of the polar body during ICSI on fertilization rate and embryo development. *Reproductive Sciences*, 17(9), 849-853.
- Arias Cea, M. E. (2013). *Optimización de la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en bovinos y evaluación de la calidad de los embriones generados* [PhD Thesis]. Universidad de La Frontera.
- Arias, M. E., Sanchez, R., & Felmer, R. (2015). Effects of different activation regimens on pronuclear formation and pre-implantation developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction, Fertility and Development*, 27(1), 249-249. <https://doi.org/10.1071/RDv27n1Ab320>
- Arias, M. E., Sánchez, R., & Felmer, R. (2016). Effect of anisomycin, a protein synthesis inhibitor, on the *in vitro* developmental potential, ploidy and embryo quality of bovine ICSI embryos. *Zygote*, 24(5), 724-732.
- Balakier, H. (1993). Fertilization and early embryology: Trippronuclear human zygotes: the first cell cycle and subsequent development. *Human Reproduction*, 8(11), 1892-1897.
- Barbosa, C. B., Devito, L. G., Martins, L. R., Blanco, I. D. P., de Lima Neto, J. F., Tsuribe, P. M., Gonçalves, C. G. P., & da Cruz Landim-Alvarenga, F. (2013). Artificial activation of bovine and equine oocytes with cycloheximide, roscovitine, strontium, or 6-dimethylaminopurine in low or high calcium concentrations. *Zygote*, 22(3), 387-394.

- Bernhardt, M. L., Padilla-Banks, E., Stein, P., Zhang, Y., & Williams, C. J. (2017). Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry is not required for fertilization-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in mouse eggs. *Cell Calcium*, 65, 63-72.
- Bernhardt, M. L., Stein, P., Carvacho, I., Krapp, C., Ardestani, G., Mehregan, A., Umbach, D. M., Bartolomei, M. S., Fissore, R. A., & Williams, C. J. (2018). TRPM7 and CaV3. 2 channels mediate  $\text{Ca}^{2+}$  influx required for egg activation at fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(44), E10370-E10378.
- Bernhardt, M. L., Zhang, Y., Erxleben, C. F., Padilla-Banks, E., McDonough, C. E., Miao, Y.-L., Armstrong, D. L., & Williams, C. J. (2015). CaV3. 2 T-type channels mediate  $\text{Ca}^{2+}$  entry during oocyte maturation and following fertilization. *Journal of cell science*, 128(23), 4442-4452.
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 1(1), 11-21.
- Bevacqua, R. J., Pereyra-Bonnet, F., Fernandez-Martin, R., & Salamone, D. F. (2010). High rates of bovine blastocyst development after ICSI-mediated gene transfer assisted by chemical activation. *Theriogenology*, 74(6), 922-931.
- Bhak, J.-S., Lee, S.-L., Ock, S.-A., Choe, S.-Y., & Rho, G.-J. (2006). Developmental rate and ploidy of embryos produced by nuclear transfer with different activation treatments in cattle. *Animal reproduction science*, 92(1-2), 37-49.
- Blake, M., Garrisi, J., Tomkin, G., & Cohen, J. (2000). Sperm deposition site during ICSI affects fertilization and development. *Fertility and sterility*, 73(1), 31-37.
- Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2018). Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction (AR)*, 10(3), 344-348.
- Bootman, M. D., Lipp, P., & Berridge, M. J. (2001). The organisation and functions of local  $\text{Ca}^{2+}$  signals. *Journal of cell science*, 114(12), 2213-2222.
- Brandman, O., Liou, J., Park, W. S., & Meyer, T. (2007). STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  levels. *Cell*, 131(7), 1327-1339.
- Brogliatti, G. M., Palasz, A. T., Rodriguez-Martinez, H., Mapletoft, R. J., & Adams, G. P. (2000). Transvaginal collection and ultrastructure of Llama (*Lama glama*) oocytes. *Theriogenology*, 54(8), 1269-1279. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00433-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00433-7)
- Cahalan, M. D. (2009). STIMulating store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Nature cell biology*, 11(6), 669-677.
- Canel, N., Bevacqua, R., Fernández-Martín, R., & Salamone, D. F. (2010). Activation with ionomycin followed by dehydroleucodine and cytochalasin B for the production of parthenogenetic and cloned bovine embryos. *Cellular Reprogramming (Formerly "Cloning and Stem Cells")*, 12(4), 491-499.
- Cardona Barberán, A., Boel, A., Vanden Meerschaut, F., Stoop, D., & Heindryckx, B. (2020). Diagnosis and treatment of male infertility-related fertilization failure. *Journal of clinical medicine*, 9(12), 3899.
- Carvacho, I., Lee, H. C., Fissore, R. A., & Clapham, D. E. (2013). TRPV3 channels mediate strontium-induced mouse-egg activation. *Cell reports*, 5(5), 1375-1386.
- Castro-Modesto, T., Mamani, P., Pella, R., Bravo, Z., Villarreal-Ugarte, S., Cancho, C., Aguila, L., Ratto, M. H., & Valdivia, M. (2022). Effect of follicle



- size on *in vitro* maturation in alpaca oocytes (*Vicugna pacos*) and the first ICSI in alpaca species. *Small Ruminant Research*, 213, 106680.
- Catt, J. W., & Rhodes, S. L. (1995). Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species. *Reproduction, fertility and development*, 7(2), 161-166.
- Cevik, M., Kocyigit, A., Sen, U., & Kuran, M. (2014). Can sequential human embryo culture media be used in bovine *in vitro* embryo culture. *Univ Vet Fak Derg*, 20, 149-153.
- Chen, C. (1986). Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *The Lancet*, 327(8486), 884-886.
- Cheng, W.-M., Wu, Z.-H., Zhang, X., Zhu, Y.-B., Pang, Y.-W., Guo, M., Wang, D., & Tian, J.-H. (2012). Effects of Different Activation Regimens on Pronuclear Formation and Developmental Competence of *In Vitro*-Matured Porcine Oocytes After Intracytoplasmic Sperm Injection. *Reproduction in domestic animals*, 47(4), 609-614.
- Chung, J.-T., Keefer, C. L., & Downey, B. R. (2000). Activation of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Theriogenology*, 53(6), 1273-1284.
- Conde, P. A., Herrera, C., Trasorras, V. L., Giuliano, S. M., Director, A., Miragaya, M. H., Chaves, M. G., Sarchi, M. I., Stivale, D., & Quintans, C. (2008). *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Animal reproduction science*, 109(1-4), 298-308.
- Curie, J. I. P. (2008). Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*, 9(4), 1-17.
- Cuthbertson, K. S., & Cobbold, P. H. (1985). Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell  $Ca^{2+}$ . *Nature*, 316(6028), 541-542.
- Dale, B., Wilding, M., Coppola, G., & Tosti, E. (2010). How do spermatozoa activate oocytes? *Reproductive biomedicine online*, 21(1), 1-3.
- De Loos, F., Van Vliet, C., van Maurik, P. v., & Kruip, T. A. (1989). Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete research*, 24(2), 197-204.
- De Sutter, P., Dozortsev, D., Cieslak, J., Wolf, G., Verlinsky, Y., & Dyban, A. (1992). Parthenogenetic activation of human oocytes by puromycin. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 9(4), 328-337.
- 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.
- Del Campo, M. R., Donoso, M. X., Del Campo, C. H., Rojo, R., Barros, C., Parrish, J. J., & Mapletoft, R. J. (1992). *In vitro* maturation of llama (*Lama glama*) oocytes. *Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction*, 1, 324-326.
- Deng, M.-Q., & Shen, S. S. (2000). A specific inhibitor of p34cdc2/cyclin B suppresses fertilization-induced calcium oscillations in mouse eggs. *Biology of reproduction*, 62(4), 873-878.
- Dinnyés, A., Hirao, Y., & Nagai, T. (1999). Parthenogenetic activation of porcine oocytes by electric pulse and/or butyrolactone I treatment. *Cloning*, 1(4), 209-216.
- Dode, M. A. N., Rodovalho, N. C., Ueno, V. G., & Fernandes, C. E. (2002). The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of bos indicus oocytes. *Animal Reproduction Science*, 69(1-2), 15-23.
- Dozortsev, D., Rybouchkin, A., De Sutter, P., & Dhont, M. (1995). Sperm plasma membrane damage prior to intracytoplasmic sperm injection: A necessary

- condition for sperm nucleus decondensation. *Human Reproduction*, 10(11), 2960-2964.
- Duchen, M. R. (2000). Mitochondria and calcium: From cell signalling to cell death. *The Journal of physiology*, 529(1), 57-68.
- Ducibella, T., & Fissore, R. (2008). The roles of  $Ca^{2+}$ , downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development. *Developmental biology*, 315(2), 257-279.
- Ducibella, T., Huneau, D., Angelichio, E., Xu, Z., Schultz, R. M., Kopf, G. S., Fissore, R., Madoux, S., & Ozil, J.-P. (2002). Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to  $Ca^{2+}$  oscillation number. *Developmental biology*, 250(2), 280-291.
- Dumollard, R., Marangos, P., Fitzharris, G., Swann, K., Duchon, M., & Carroll, J. (2004). *Sperm-triggered  $[Ca^{2+}]$  oscillations and  $Ca^{2+}$  homeostasis in the mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production.*
- Dupont, G. (1998). Link between fertilization-induced  $Ca^{2+}$  oscillations and relief from metaphase II arrest in mammalian eggs: A model based on calmodulin-dependent kinase II activation. *Biophysical chemistry*, 72(1-2), 153-167.
- El-Sayed, A., Ashour, G., Kamel, A. M., & El-Bahrawy, K. A. (2015). Assessment of embryo production of Dromedary (*Camelus dromedarius*) using two semen sources and two *in vitro* fertilization techniques. *Egypt. J. Anim. Prod*, 52, 153-160.
- Emuta, C., & Horiuchi, T. (2001). Effects of timing of activation and aging of bovine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) on cleavage and subsequent embryonic development *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development*, 47(6), 399-405.
- Fathi, M., Moawad, A. R., & Badr, M. R. (2018). Production of blastocysts following *in vitro* maturation and fertilization of dromedary camel oocytes vitrified at the germinal vesicle stage. *PLoS One*, 13(3), e0194602.
- Fawzy, M., Emad, M., Mahran, A., Sabry, M., Fetih, A. N., Abdelghafar, H., & Rasheed, S. (2018). Artificial oocyte activation with SrCl<sub>2</sub> or calcimycin after ICSI improves clinical and embryological outcomes compared with ICSI alone: Results of a randomized clinical trial. *Human Reproduction*, 33(9), 1636-1644. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey258>
- Felmer, R., & Arias, M. E. (2015). Activation treatment of recipient oocytes affects the subsequent development and ploidy of bovine parthenogenetic and somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos. *Molecular reproduction and development*, 82(6), 441-449.
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: Reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991-1004.
- Ferrer-Buitrago, M., Bonte, D., De Sutter, P., Leybaert, L., & Heindryckx, B. (2018). Single  $Ca^{2+}$  transients vs oscillatory  $Ca^{2+}$  signaling for assisted oocyte activation: Limitations and benefits. *Reproduction (Cambridge, England)*, 155(2), R105-R119. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0098>
- Galli, C., Vassiliev, I., Lagutina, I., Galli, A., & Lazzari, G. (2003). Bovine embryo development following ICSI: Effect of activation, sperm capacitation and pre-treatment with dithiothreitol. *Theriogenology*, 60(8), 1467-1480.
- García Roselló, E. (2008). *Análisis de diferentes factores que afectan al rendimiento de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en la especie porcina.* Universidad de Murcia.

- Gardiner, D. M., & Grey, R. D. (1983). Membrane junctions in *Xenopus* eggs: Their distribution suggests a role in calcium regulation. *The Journal of cell biology*, 96(4), 1159-1163.
- Giritharan, G., Li, M. W., De Sebastiano, F., Esteban, F. J., Horcajadas, J. A., Lloyd, K. C., Donjacour, A., Maltepe, E., & Rinaudo, P. F. (2010). Effect of ICSI on gene expression and development of mouse preimplantation embryos. *Human reproduction*, 25(12), 3012-3024.
- Gómez Elías, M. D. (2019). *Estudios funcionales y moleculares sobre la regulación de la capacidad fertilizante del espermatozoide y la activación del ovocito*. Universidad de Buenos Aires.
- Gomez, O., Choque, D., Henao, F., Escobedo, M., & Valverde, N. (2013). Comparación de tres métodos de recuperación de Complejos Ovocito-Cúmulus (COCs) de alpaca recuperados de ovarios postmortem en un Camal. *Spermova*, 3(1), 103-104.
- Gomez-Fernandez, C., Pozo-Guisado, E., Ganán-Parra, M., Perianes, M. J., Alvarez, I. S., & Martín-Romero, F. J. (2009). Relocalization of STIM1 in mouse oocytes at fertilization: Early involvement of store-operated calcium entry. *Reproduction*, 138(2), 211.
- Gordon, I. (1994). Laboratory production of cattle embryos CAB International. *Biotechnology in Agriculture*, 11, 640.
- Gordon, I., & Lu, K. H. (1990). Production of embryos *in vitro* and its-impact on livestock production. *Theriogenology*, 33(1), 77-87.
- Habsah, B., Musaddin, K., Bahtiar, A. I., Ahmad, J., & Azlin, A. S. (2016). Effects of calcium ionophore A23187 on oocyte activation, embryo development following intracytoplasmic sperm injection technique and pregnancy rate in bovine. *J. Trop. Agric. and Fd. Sc*, 44(2), 229-241.
- Hallap, T., Håård, M., Jaakma, Ü., Larsson, B., & Rodriguez-Martinez, H. (2004). Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? *Theriogenology*, 62(3-4), 702-713.
- Han, B.-S., & Gao, J.-L. (2013). Effects of chemical combinations on the parthenogenetic activation of mouse oocytes. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 5(5), 1281-1288. <https://doi.org/10.3892/etm.2013.1018>
- Hardarson, T. H., Lundin, K., & Hamberger, L. (2000). The position of the metaphase II spindle cannot be predicted by the location of the first polar body in the human oocyte. *Human Reproduction*, 15(6), 1372-1376.
- Herbert, M., Murdoch, A. P., & Gillespie, J. I. (1995). The thiol reagent, thimerosal induces intracellular calcium oscillations in mature human oocytes. *Human Reproduction*, 10(8), 2183-2186.
- Horner, V. L., & Wolfner, M. F. (2008). Transitioning from egg to embryo: Triggers and mechanisms of egg activation. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 237(3), 527-544.
- Hosseini, S. M., Hajian, M., Moulavi, F., Shahverdi, A. H., & Nasr-Esfahani, M. H. (2008). Optimized combined electrical-chemical parthenogenetic activation for *in vitro* matured bovine oocytes. *Animal reproduction science*, 108(1-2), 122-133.
- Hosseini, S. M., Hajian, M., Ostadhosseini, S., Forouzanfar, M., Abedi, P., Jafarpour, F., Gourabi, H., Shahverdi, A. H., Vosough, A., & Ghanaie, H. R. (2015). Contrasting effects of G1. 2/G2. 2 and SOF1/SOF2 embryo culture media on pre-and post-implantation development of non-transgenic and transgenic cloned goat embryos. *Reproductive Biomedicine OnLine*, 31(3), 372-383.

- Huanca, W., Condori, R. L., Chileno, M. A., Cainzos, J., Becerra, J. J., Quintela, L. A., & Herradon, P. G. (2010). *In vivo* maturation and *in vitro* fertilization of alpaca oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(1), 204-205.
- Jones, K. T. (2005). Mammalian egg activation: From Ca<sup>2+</sup> spiking to cell cycle progression. *Reproduction*, 130(6), 813-823.
- Jones, K. T. (2007). Intracellular calcium in the fertilization and development of mammalian eggs. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34(10), 1084-1089.
- 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.
- Kasai, T., Hoshi, K., & Yanagimachi, R. (1999). Effect of sperm immobilisation and demembration on the oocyte activation rate in the mouse. *Zygote*, 7(3), 187-193.
- Kashir, J., Heindryckx, B., Jones, C., De Sutter, P., Parrington, J., & Coward, K. (2010). Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility. *Human reproduction update*, 16(6), 690-703.
- Kashir, J., Jones, C., Lee, H. C., Rietdorf, K., Nikiforaki, D., Durrans, C., Ruas, M., Tee, S. T., Heindryckx, B., & Galione, A. (2011). Loss of activity mutations in phospholipase C zeta (PLC $\zeta$ ) abolishes calcium oscillatory ability of human recombinant protein in mouse oocytes. *Human reproduction*, 26(12), 3372-3387.
- Keefer, C. L. (1989). Fertilization by sperm injection in the rabbit. *Gamete Research*, 22(1), 59-69.
- Kharche, S. D., & Birade, H. S. (2013). *Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for in vitro embryo production: A review*.
- Kharche, S., Pathak, J., Agarwal, S., Kushwah, B., & Sikarwar, A. (2016). Effect of Ca Ionophore On Blastocyst Production Following Intracytoplasmic Sperm Injection in Caprine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(4), 611-617. <https://doi.org/10.1111/rda.12701>
- Khatir, H., Anouassi, A., & Tibary, A. (2004). Production of dromedary (*Camelus dromedarius*) embryos by IVM and IVF and co-culture with oviductal or granulosa cells. *Theriogenology*, 62(7), 1175-1185. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.016>
- Kim, J.-W., Kim, S.-D., Yang, S.-H., Yoon, S.-H., Jung, J.-H., & Lim, J.-H. (2014). Successful pregnancy after SrCl<sub>2</sub> oocyte activation in couples with repeated low fertilization rates following calcium ionophore treatment. *Systems biology in reproductive medicine*, 60(3), 177-182.
- Kimura, Y., & Yanagimachi, R. (1995). Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biology of reproduction*, 52(4), 709-720.
- Kline, D., & Kline, J. T. (1992). Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Developmental biology*, 149(1), 80-89.
- Kochhar, H. S., Kochhar, K. P., Basrur, P. K., & King, W. A. (2003). Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of *in vitro* produced bovine embryos. *Animal reproduction science*, 77(1-2), 33-49.
- Korkmaz, Ö., Küplülü, Ş., Ağca, Y., & Polat, I. M. (2013). Effect of oocyte quality and activation protocols on bovine embryo development following intracytoplasmic sperm injection. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37(1), 26-30.

- Laines-Arcce, I. M., Contreras, M., & Olaguivel, C. A. (2021). *Evaluación de dos medios de cultivo en la producción de embriones in vitro de alpacas (Vicugna pacos)*.
- Landeo, L., Mendoza, J., Manrique, L., Taibe, E., Molina, R., Contreras, J., Ruiz, J., Landeo, L., Mendoza, J., Manrique, L., Taibe, E., Molina, R., Contreras, J., & Ruiz, J. (2017). First llama born by *in vitro* fertilization. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(1), 188-188. <https://doi.org/10.1071/RDv29n1Ab158>
- Lee, J.-W., Chang, H.-C., Wu, H.-Y., Liu, S.-S., Wang, C.-H., Chu, C.-Y., & Shen, P.-C. (2015). Effects of sperm pretreatment and embryo activation methods on the development of bovine embryos produced by intracytoplasmic sperm injection. *Reproductive Biology*, 15(3), 154-162.
- Lee, K., Wang, C., & Machaty, Z. (2012). STIM1 is required for Ca<sup>2+</sup> signaling during mammalian fertilization. *Developmental biology*, 367(2), 154-162.
- Liu, L., Ju, J.-C., & Yang, X. (1998). Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 49(3), 298-307.
- Liu, L., & Yang, X. (1999). Interplay of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase inactivation during metaphase-to-interphase transition of activated bovine oocytes. *Biology of reproduction*, 61(1), 1-7.
- Liu, Y., Cao, Y. X., Zhang, Z. G., & Xing, Q. (2013). Artificial oocyte activation and human failed-matured oocyte vitrification followed by *in vitro* maturation. *Zygote (Cambridge, England)*, 21(1), 71-76. <https://doi.org/10.1017/S0967199411000530>
- Loi, P., Ledda, S., Fulka Jr, J., Cappai, P., & Moor, R. M. (1998). Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: Effect of activation protocols. *Biology of reproduction*, 58(5), 1177-1187.
- Lorenzo González, P. L. (1992). *Maduración in vitro de oocitos de ganado vacuno* [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universidad Complutense de Madrid]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=15304>
- Lu, Q., Chen, Z. J., Gao, X., Ma, S. Y., Li, M., Hu, J. M., & Li, Y. (2006). Oocyte activation with calcium ionophore A23187 and puromycin on human oocytes that fail to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 41(3), 182-185.
- Macas, E., Imthurn, B., Rosselli, M., & Keller, P. J. (1996). Fertilization and early embryology: The chromosomal complements of multipronuclear human zygotes resulting from intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction*, 11(11), 2496-2501.
- Machity, Z., Wang, W.-H., Day, B. N., & Prather, R. S. (1997). Complete Activation of Porcine Oocytes Induced by the Sulfhydryl Reagent, Thimerosal. *Biology of reproduction*, 57(5), 1123-1127.
- Madgwick, S., Levasseur, M., & Jones, K. T. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase II, and not protein kinase C, is sufficient for triggering cell-cycle resumption in mammalian eggs. *Journal of cell science*, 118(17), 3849-3859.
- Mantikou, E., Youssef, M. A. F. M., van Wely, M., van der Veen, F., Al-Inany, H. G., Repping, S., & Mastenbroek, S. (2013). Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: A systematic review. *Human Reproduction Update*, 19(3), 210-220. <https://doi.org/10.1093/humupd/dms061>
- Mayes, M. A., Stogsdill, P. L., & Prather, R. S. (1995). Parthenogenic activation of pig oocytes by protein kinase inhibition. *Biology of reproduction*, 53(2), 270-275.

- Meerschaut, F. V., Nikiforaki, D., Heindryckx, B., & De Sutter, P. (2014). Assisted oocyte activation following ICSI fertilization failure. *Reproductive biomedicine online*, 28(5), 560-571.
- Mehlmann, L. M., & Kline, D. (1994). Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: Calcium release in response to sperm or inositol trisphosphate is enhanced after meiotic maturation. *Biology of reproduction*, 51(6), 1088-1098.
- Miao, Y.-L., Stein, P., Jefferson, W. N., Padilla-Banks, E., & Williams, C. J. (2012). Calcium influx-mediated signaling is required for complete mouse egg activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(11), 4169-4174.
- Miragaya, M. H., Herrera, C., Quintans, C. J., Chaves, M. G., Capdevielle, E. F., Giuliano, S. M., Pinto, M., Egey, J., Rutter, B., & Pasqualini, R. S. (2003). Producción *in vitro* de embriones de llama (*Lama glama*) por la técnica de ICSI: Resultados preliminares. *Memorias del III Congreso Mundial sobre Camélidos*, 1, 267-270.
- Moawad, A. R., Ghoneim, I. M., Darwish, G. M., Badr, M. R., & EL-Wishy, D. A. E.-B. and A. B. A. (2020). Factors affecting *in vitro* embryo production: Insights into dromedary camel. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 35(2), 119-141. <https://doi.org/10.12750/JARB.35.2.119>
- Moro, L. N., Sestelo, A. J., & Salamone, D. F. (2014). Evaluation of cheetah and leopard spermatozoa developmental capability after interspecific ICSI with domestic cat oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(4), 693-700.
- Moses, R. M., & Kline, D. (1995). Release of mouse eggs from metaphase arrest by protein synthesis inhibition in the absence of a calcium signal or microtubule assembly. *Molecular reproduction and development*, 41(2), 264-273.
- Moulavi, F., Saadeldin, I. M., Swelum, A. A., Tasdighi, F., Hosseini-Fahraji, H., & Hosseini, S. M. (2021). Oocyte vitrification induces loss of DNA methylation and histone acetylation in the resulting embryos derived using ICSI in dromedary camel. *Zygote*, 29(5), 383-392.
- Munné, S., Tang, Y.-X., Grifo, J., & Cohen, J. (1993). Origin of single pronucleated human zygotes. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 10(4), 276-279.
- Nagy, Z. P., Liu, J., Joris, G., Bocken, G., Desmet, B., Van Ranst, A., Vankelecom, A., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. C. (1995). The influence of the site of sperm deposition and mode of oolemma breakage at intracytoplasmic sperm injection on fertilization and embryo development rates. *Human Reproduction*, 10(12), 3171-3177.
- Nedambale, T. L., Du, F., Yang, X., & Tian, X. C. (2006). Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with  $\beta$ -mercaptoethanol. *Animal reproduction science*, 93(1-2), 61-75.
- Nikiforaki, D., Vanden Meerschaut, F., de Roo, C., Lu, Y., Ferrer-Buitrago, M., de Sutter, P., & Heindryckx, B. (2016). Effect of two assisted oocyte activation protocols used to overcome fertilization failure on the activation potential and calcium releasing pattern. *Fertility and Sterility*, 105(3), 798-806.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.007>
- Niwa, K., & Ohgoda, O. (1988). Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*, 30(4), 733-741.

- Nomikos, M., Kashir, J., & Lai, F. A. (2017). The role and mechanism of action of sperm PLC-zeta in mammalian fertilisation. *Biochemical Journal*, 474(21), 3659-3673.
- Norozi-Hafshejani, M., Tavalaei, M., Azadi, L., Bahadorani, M., & Nasr-Esfahani, M. H. (2018). Effects of assisted oocyte activation with calcium- ionophore and strontium chloride on *in vitro* ICSI outcomes. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(11), 1109.
- 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.
- Ock, S. A., Bhak, J. S., Balasubramanian, S., Lee, H. J., Choe, S. Y., & Rho, G. J. (2003). Different activation treatments for successful development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Zygote*, 11(1), 69-76.
- Oh, J. S., Susor, A., & Conti, M. (2011). Protein tyrosine kinase Wee1B is essential for metaphase II exit in mouse oocytes. *Science*, 332(6028), 462-465.
- Ohlweiler, L. U., Brum, D. S., Leivas, F. G., Moyses, A. B., Ramos, R. S., Klein, N., Mezzalira, J. C., & Mezzalira, A. (2013). Intracytoplasmic sperm injection improves *in vitro* embryo production from poor quality bovine oocytes. *Theriogenology*, 79(5), 778-783. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.12.002>
- Oikawa, T., Takada, N., Kikuchi, T., Numabe, T., Takenaka, M., & Horiuchi, T. (2005). Evaluation of activation treatments for blastocyst production and birth of viable calves following bovine intracytoplasmic sperm injection. *Animal reproduction science*, 86(3-4), 187-194.
- Ozil, J.-P., Banrezes, B., Tóth, S., Pan, H., & Schultz, R. M. (2006). Ca<sup>2+</sup> oscillatory pattern in fertilized mouse eggs affects gene expression and development to term. *Developmental biology*, 300(2), 534-544.
- Ozil, J.-P., & Huneau, D. (2001). Activation of rabbit oocytes: The impact of the Ca<sup>2+</sup> signal regime on development. *Development*, 128(6), 917-928.
- Palermo, G. D., Cohen, J., Alikani, M., Adler, A., & Rosenwaks, Z. (1995). Development and implementation of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reproduction, fertility and development*, 7(2), 211-217.
- Palma, G. A. (2001). Producción *in vitro* de embriones bovinos. *Bioteconología de la Reproducción. Buenos Aires: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)*, 225-294.
- Parrish, J. J., Krogenaes, A., & Susko-Parrish, J. L. (1995). Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, 44(6), 859-869.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Winer, M. A., & First, N. L. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of reproduction*, 38(5), 1171-1180.
- Perocchi, F., Gohil, V. M., Girgis, H. S., Bao, X. R., McCombs, J. E., Palmer, A. E., & Mootha, V. K. (2010). MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca<sup>2+</sup> uptake. *Nature*, 467(7313), 291-296.
- Phillips, K. P., Petrunewich, M. A. F., Collins, J. L., Booth, R. A., Liu, X. J., & Baltz, J. M. (2002). Inhibition of MEK or cdc2 kinase parthenogenetically activates mouse eggs and yields the same phenotypes as Mos<sup>-/-</sup> parthenogenotes. *Developmental biology*, 247(1), 210-223.
- Pichardo, M. J. E. H. (2017). *Formación de pronúcleos mediante la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) seleccionados por unión a*

- la zona pelúcida en ovocitos de ovino activados químicamente*. [PhD Thesis]. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Pickering, S. J., Johnson, M. H., Braude, P. R., & Houlston, E. (1988). Cytoskeletal organization in fresh, aged and spontaneously activated human oocytes. *Human Reproduction*, 3(8), 978-989.
- Purvis, K., & Egdetveit, I. (1993). Factors affecting sperm yield during swim-up. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 10(2), 145-150.
- Ratto, M., Berland, M., Huanca, W., Singh, J., & Adams, G. P. (2005). *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes. *Theriogenology*, 63(9), 2445-2457.
- Ratto, M., Gomez, C., Berland, M., & Adams, G. P. (2007). Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Animal Reproduction Science*, 97(3), 246-256. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.02.002>
- Reichman, D. E., Jackson, K. V., & Racowsky, C. (2010). Incidence and development of zygotes exhibiting abnormal pronuclear disposition after identification of two pronuclei at the fertilization check. *Fertility and sterility*, 94(3), 965-970.
- Rho, G.-J., Kawarsky, S., Johnson, W. H., Kochhar, K., & Betteridge, K. J. (1998). Sperm and oocyte treatments to improve the formation of male and female pronuclei and subsequent development following intracytoplasmic sperm injection into bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, 59(4), 918-924.
- Rizzuto, R., Bernardi, P., & Pozzan, T. (2000). Mitochondria as all-round players of the calcium game. *The Journal of physiology*, 529(1), 37-47.
- Rogers, N. T., Halet, G., Piao, Y., Carroll, J., Ko, M. S. H., & Swann, K. (2006). The absence of a Ca<sup>2+</sup> signal during mouse egg activation can affect parthenogenetic preimplantation development, gene expression patterns, and blastocyst quality. *Reproduction*, 132(1), 45-57.
- 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>
- Rybouchkin, A., Dozortsev, D., De Sutter, P., & Dhont, M. (1996). Factors affecting the role of the spindle during early response of mouse oocytes to ethanol stimulation. *Journal of Experimental Zoology*, 275(6), 469-475.
- Sang, Q., Li, B., Kuang, Y., Wang, X., Zhang, Z., Chen, B., Wu, L., Lyu, Q., Fu, Y., & Yan, Z. (2018). Homozygous mutations in WEE2 cause fertilization failure and female infertility. *The American Journal of Human Genetics*, 102(4), 649-657.
- Sansinena, M. J., Taylor, S. A., Taylor, P. J., Schmidt, E. E., Denniston, R. S., & Godke, R. A. (2007). *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Animal reproduction science*, 99(3-4), 342-353.
- Saunders, C. M., Larman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K., & Lai, F. A. (2002). PLC $\zeta$ : A sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development.
- Sfontouris, I. A., Kolibianakis, E. M., Lainas, G. T., Petsas, G. K., Tarlatzis, B. C., & Lainas, T. G. (2017). Blastocyst development in a single medium compared to sequential media: A prospective study with sibling oocytes. *Reproductive Sciences*, 24(9), 1312-1318.



- Shirazi, A., Ostad-Hosseini, S., Ahmadi, E., Heidari, B., & Shams-Esfandabadi, N. (2009). *In vitro* developmental competence of ICSI-derived activated ovine embryos. *Theriogenology*, *71*(2), 342-348. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.027>
- Shoji, S., Yoshida, N., Amanai, M., Ohgishi, M., Fukui, T., Fujimoto, S., Nakano, Y., Kajikawa, E., & Perry, A. C. (2006). Mammalian Emi2 mediates cytostatic arrest and transduces the signal for meiotic exit via Cdc20. *The EMBO journal*, *25*(4), 834-845.
- Silva, C. P., Kommineni, K., Oldenbourg, R., & Keefe, D. L. (1999). The first polar body does not predict accurately the location of the metaphase II meiotic spindle in mammalian oocytes. *Fertility and sterility*, *71*(4), 719-721.
- Skidmore, J. A., Crichton, E. G., Malo, C. M., Vaughan, J. L., Wani, N. A., & Herrid, M. (2020). Reproductive technologies in camelids. En *Reproductive Technologies in Animals* (pp. 119-134). Elsevier.
- Somfai, T., Bodó, S., Nagy, S., Papp, A. B., Ivancsics, J., Baranyai, B., Gocza, E., & Kovacs, A. (2002). Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, *37*(5), 285-290.
- Stein, P., Savy, V., Williams, A. M., & Williams, C. J. (2020). Modulators of calcium signalling at fertilization. *Open Biology*, *10*(7), 200118.
- Stringfellow, D. A., & Seidel, S. M. (1998). *Manual of the international embryo transfer society*. The Society.
- Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Northey, D. L., Schutzkus, V., & First, N. L. (1994). Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Developmental biology*, *166*(2), 729-739.
- Suttner, R., Zakhartchenko, V., Stojkovic, P., Müller, S., Alberio, R., Medjugorac, I., Brem, G., Wolf, E., & Stojkovic, M. (2000). Intracytoplasmic sperm injection in bovine: Effects of oocyte activation, sperm pretreatment and injection technique. *Theriogenology*, *54*(6), 935-948.
- Swann, K. (1990). A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development*, *110*(4), 1295-1302.
- Swann, K. (1991). Thimerosal causes calcium oscillations and sensitizes calcium-induced calcium release in unfertilized hamster eggs. *FEBS letters*, *278*(2), 175-178.
- Swann, K., & Lai, F. A. (2016). Egg activation at fertilization by a soluble sperm protein. *Physiological Reviews*, *96*(1), 127-149.
- Swann, K., Larman, M. G., Saunders, C. M., & Lai, F. A. (2004). The cytosolic sperm factor that triggers Ca<sup>2+</sup> oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLCζ. *Reproduction*, *127*(4), 431-439.
- Swann, K., & Yu, Y. (2004). The dynamics of calcium oscillations that activate mammalian eggs. *International Journal of Developmental Biology*, *52*(5-6), 585-594.
- Szollosi, M. S., Kubiak, J. Z., Debey, P. de, de Pennart, H., Szollosi, D., & Maro, B. (1993). Inhibition of protein kinases by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. *Journal of Cell Science*, *104*(3), 861-872.
- Takahashi, T., Kikuchi, T., Kidokoro, Y., & Shirakawa, H. (2013). Ca<sup>2+</sup> influx-dependent refilling of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores determines the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations in fertilized mouse eggs. *Biochemical and biophysical research communications*, *430*(1), 60-65.

- Tasripoo, K., Srisakwattana, K., Nualchuen, W., & Sophon, S. (2012). Effects of various activators on bovine embryonic development following intracytoplasmic sperm injection. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 2, 167-173.
- Tesarik, J., & Mendoza, C. (1999). *In vitro* fertilization by intracytoplasmic sperm injection. *Bioessays*, 21(9), 791-801.
- Tesarik, J., & Sousa, M. (1995). More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocyte activation with calcium ionophore. *Fertility and sterility*, 63(2), 343-349.
- Tesarik, J., Sousa, M., & Testart, J. (1994). Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, 9(3), 511-518.
- Thomas, A. D., Meyers, S. A., & Ball, B. A. (2006). Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology*, 65(8), 1531-1550.
- Toranzo, G. S., López, L. A., Martínez, J. Z., Bühler, M. G., & Bühler, M. I. (2010). Involvement of the dehydroleucodine alpha-methylene-gamma-lactone function in GVBD inhibition in *Bufo arenarum* oocytes. *Zygote*, 18(1), 41-49.
- Torner, H., Heleil, B., Alm, H., Ghoneim, I. M., Srsen, V., Kanitz, W., Tuchscherer, A., & Fattouh, E. M. (2003). Changes in cumulus–oocyte complexes of pregnant and non-pregnant camels (*Camelus dromedarius*) during maturation *in vitro*. *Theriogenology*, 60(5), 977-987.
- Toth, S., Huneau, D., Banrezes, B., & Ozil, J.-P. (2006). Egg activation is the result of calcium signal summation in the mouse. *Reproduction*, 131(1), 27-34.
- Trasorras, V., Baca Castex, C., Alonso, A., Giuliano, S., Santa Cruz, R., Arraztoa, C., Chaves, G., Rodríguez, D., Neild, D., & Miragaya, M. (2014). First llama (*Lama glama*) pregnancy obtained after *in vitro* fertilization and *in vitro* culture of gametes from live animals. *Animal Reproduction Science*, 148(1), 83-89. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.04.006>
- Trasorras, V., Chaves, M., Miragaya, M., Pinto, M., Rutter, B., Flores, M., & Agüero, A. (2009). Effect of eCG Superstimulation and Buserelin on Cumulus–Oocyte Complexes Recovery and Maturation in Llamas (*Lama glama*). *Reproduction in Domestic Animals*, 44(3), 359-364. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00972.x>
- Trasorras, V., Giuliano, S., Chaves, G., Neild, D., Agüero, A., Carretero, M., Pinto, M., Baca Castex, C., Alonso, A., & Rodríguez, D. (2012). *In vitro* Embryo Production in Llamas (*Lama glama*) from *In vivo* Matured Oocytes with Raw Semen Processed with Androcoll-E using Defined Embryo Culture Media. *Reproduction in domestic animals*, 47(4), 562-567.
- Tsaadon, L., Kaplan-Kraicer, R., & Shalgi, R. (2008). Myristoylated alanine-rich C kinase substrate, but not Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II, is the mediator in cortical granules exocytosis. *Reproduction*, 135, 613-624.
- Uehara, T., & Yanagimachi, R. (1976). Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biology of reproduction*, 15(4), 467-470.
- Vanden Meerschaut, F., Nikiforaki, D., De Roo, C., Lierman, S., Qian, C., Schmitt-John, T., De Sutter, P., & Heindryckx, B. (2013). Comparison of pre-and post-implantation development following the application of three artificial activating stimuli in a mouse model with round-headed sperm cells deficient for oocyte activation. *Human Reproduction*, 28(5), 1190-1198.

- Vazquez-Avendaño, J. R., Hernández-Martínez, S., Hernández-Pichardo, J. E., Rivera-Rebolledo, J. A., Ambriz-García, D. A., & Navarro-Maldonado, M. D. C. (2017). Efecto del uso de medio secuencial humano en la producción de blastocistos de hembra *Ovis canadensis mexicana* por clonación manual interespecies. *Acta zoológica mexicana*, 33(2), 328-338.
- Versieren, K., Heindryckx, B., Lierman, S., Gerris, J., & De Sutter, P. (2010). Developmental competence of parthenogenetic mouse and human embryos after chemical or electrical activation. *Reproductive biomedicine online*, 21(6), 769-775.
- Vichera, G., Alfonso, J., Duque, C. C., Silvestre, M. A., Pereyra-Bonnet, F., Fernández-Martín, R., & Salamone, D. (2010). Chemical activation with a combination of ionomycin and dehydroleucodine for production of parthenogenetic, ICSI and cloned bovine embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(6), e306-e312.
- Visconti, P. E., Krapf, D., De La Vega-beltrán, J. L., Acevedo, J. J., & Darszon, A. (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian journal of andrology*, 13(3), 395.
- Wakai, T., Zhang, N., Vangheluwe, P., & Fissore, R. A. (2013). Regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> oscillations in mammalian eggs. *Journal of cell science*, 126(24), 5714-5724.
- Wang, C., Lee, K., Gajdócsi, E., Papp, Á. B., & Machaty, Z. (2012). Orai1 mediates store-operated Ca<sup>2+</sup> entry during fertilization in mammalian oocytes. *Developmental biology*, 365(2), 414-423.
- Wang, C., Zhang, L., Jaeger, L. A., & Machaty, Z. (2015). Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry sustains the fertilization Ca<sup>2+</sup> signal in pig eggs. *Biology of reproduction*, 93(1), 25-1.
- Wang, W., Sun, Q., Hosoe, M., & Shioya, Y. (1997). Calcium- and meiotic-spindle-independent activation of pig oocytes by the inhibition of staurosporine-sensitive protein kinases. *Zygote (Cambridge, England)*, 5(1), 75-82. <https://doi.org/10.1017/s0967199400003580>
- Wang, W.-H., Meng, L., Hackett, R. J., Odenbourg, R., & Keefe, D. L. (2001). The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes. *Fertility and sterility*, 75(2), 348-353.
- Wani, N. A. (2008). Chemical activation of *in vitro* matured dromedary camel (*Camelus dromedarius*) oocytes: Optimization of protocols. *Theriogenology*, 69(5), 591-602.
- Wani, N. A. (2009). *In vitro* embryo production in camel (*Camelus dromedarius*) from *in vitro* matured oocytes fertilized with epididymal spermatozoa stored at 4°C. *Animal Reproduction Science*, 111(1), 69-79. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.02.005>
- Wani, N. A. (2021). *In vitro* embryo production (IVEP) in camelids: Present status and future perspectives. *Reproductive Biology*, 21(1), 100471.
- Wani, N. A., & Hong, S. (2018). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of *in vitro* matured oocytes with stored epididymal spermatozoa in camel (*Camelus dromedarius*): Effect of exogenous activation on *in vitro* embryo development. *Theriogenology*, 113, 44-49. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.02.004>
- Wani, N. A., & Nowshari, M. A. (2005). Kinetics of nuclear maturation and effect of holding ovaries at room temperature on *in vitro* maturation of camel (*Camelus dromedarius*) oocytes. *Theriogenology*, 64(1), 75-85.

- Wani, N. A., & Skidmore, J. A. (2010). Ultrasonographic-guided retrieval of cumulus oocyte complexes after super-stimulation in dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology*, 74(3), 436-442. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.026>
- Wani, N., & Wernery, U. (2010). *In Vitro* Maturation of Dromedary (*Camelus dromedarius*) Oocytes: Effect of Different Protein Supplementations and Epidermal Growth Factor\*. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(5), e189-e193. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01547.x>
- Watanabe, M., Lôbo, R., Franceschini, P., Dayan, A., Vila, R., Galerani, M., & Watanabe, Y. (1998). Produção *in vitro* de embriões por sessão de aspiração em fêmeas nelore. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, 26(1), 382-383.
- Williams, C. J. (2002). Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Human reproduction update*, 8(4), 313-321.
- Xu, K. P., Greve, T., Smith, S., & Hyttel, P. (1986). Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation *in vitro*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 27(4), 505-519.
- Yanagimachi, R. (1998). Intracytoplasmic sperm injection experiments using the mouse as a model. *Human Reproduction*, 13(suppl\_1), 87-98.
- Yanagimachi, R. (2005). Intracytoplasmic injection of spermatozoa and spermatogenic cells: Its biology and applications in humans and animals. *Reproductive biomedicine online*, 10(2), 247-288.
- Yang, X., Presicce, G. A., Moraghan, L., Jiang, S., & Foote, R. H. (1994). Synergistic effect of ethanol and cycloheximide on activation of freshly matured bovine oocytes. *Theriogenology*, 41(2), 395-403.
- Yeste, M. (2013a). Boar spermatozoa within the oviductal environment (III): Fertilisation. En *Boar Reproduction* (pp. 407-467). Springer.
- Yeste, M., Jones, C., Amdani, S. N., Patel, S., & Coward, K. (2016). Oocyte activation deficiency: A role for an oocyte contribution? *Human reproduction update*, 22(1), 23-47.
- Yoon, S.-Y., Eum, J. H., Lee, J. E., Lee, H. C., Kim, Y. S., Han, J. E., Won, H. J., Park, S. H., Shim, S. H., & Lee, W. S. (2012). Recombinant human phospholipase C zeta 1 induces intracellular calcium oscillations and oocyte activation in mouse and human oocytes. *Human Reproduction*, 27(6), 1768-1780.
- Younis, A. I., Brackett, B. G., & Fayerer-Hosken, R. A. (1989). Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete research*, 23(2), 189-201.
- Yu, Y., Nomikos, M., Theodoridou, M., Nounesis, G., Lai, F. A., & Swann, K. (2012). PLC $\zeta$  causes Ca<sup>2+</sup> oscillations in mouse eggs by targeting intracellular and not plasma membrane PI (4, 5) P2. *Molecular biology of the cell*, 23(2), 371-380.

## **ANEXOS**

**Anexo 1.** Soluciones stock para la preparación de los medios de cultivo utilizados en la producción *in vitro* de embriones de alpaca.

### **L-Glutamina**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
L-Glutamina	0,146 g
Agua milli-Q	10 ml
Separar en alícuotas de 20 y 200 µl y congelar a -20 °C	

### **17-β Estradiol**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
17-β Estradiol	0,002 g
Agua milli-Q	10 ml
Separar en alícuotas de 10 µl y congelar a -20 °C	

### **FSH**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
FSH	0,005 g
TCM-199	10 ml
Separar en alícuotas de 20 µl y congelar a -20 °C	

### **LH**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
LH	0,005 g
TCM-199	10 ml
Separar en alícuotas de 20 µl y congelar a -20 °C	

### **Piruvato de Sodio**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Piruvato de sodio	0,11 g
Agua milli-Q	10 ml
Separar en alícuotas de 50 y 100 µl y congelar a -20 °C	

### **Myoinositol**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Myoinositol	0,5 g
Agua milli-Q	10 ml
Separar en alícuotas de 120 µl y congelar a -20 °C	

### **Ácido cítrico**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Ácido cítrico	1 g
Agua milli-Q	10 ml
Separar en alícuotas de 15 µl y congelar a -20 °C	

**Anexo 2.** Soluciones stock para la preparación de los medios de activación de ovocitos post-ICSI.

### **Ionomicina**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Ionomicina	0,001 g
TCM-199	1,34 ml
Separar en alícuotas de 60 µl y congelar a -20 °C	

### **6-DMAP**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
6-DMAP	0,031 g
Agua milli-Q	1 ml
Separar en alícuotas de 100 µl y congelar a -20 °C	

### **SrCl<sub>2</sub>**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
SrCl <sub>2</sub>	0,1585 g
Agua milli-Q	1 ml
Separar en alícuotas de 80 µl y congelar a -20 °C	

**Anexo 3.** Composición de la solución salina fisiológica con gentamicina.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Cantidad</b>
Solución salina fisiológica	154 mM	1 L
Gentamicina 160 mg/ml	80 µg/ml	500 µl

**Anexo 4.** Composición del medio de manipulación.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Cantidad</b>
Agua milli-Q	-	1 L
Medium 199 (M2520)	-	14,7 g
NaHC <sub>3</sub>	8 mM	0,672056 g
Gentamicina 160 mg/ml	80 µg/ml	500 µl

**Anexo 5.** Composición del medio de maduración.

Componentes	Concentración final	Cantidad
TCM – 199	-	4,5 ml
SFB	10%	0,5 ml
Piruvato de Sodio*	0,6 mM	30 µl
FSH*	2,5 µg/mL	25 µl
LH*	2,5 µg/mL	25 µl
L-Glutamina*	29,2 µg/mL	10 µl
17-β estradiol*	0,2 µg/mL	5 µl
IGF-I	10 ng/mL	5 µl
EGF	10 ng/mL	5 µl
Gentamicina 10 mg/ml	50 µg/ml	25 µl

\* Soluciones de stock

**Anexo 6.** Composición del medio Tyrode's Albúmina Lactato Piruvato (TALP).

Componentes	TALP: Tyrode's Albúmina Lactato Piruvato		
	Sperm-TALP	Fert-TALP	TALP-HEPES
NaCl	100 mM	114 mM	114 mM
KCl	3,1 mM	3,2 mM	3,1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM	25 mM	2 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 mM	0,3 mM	0,3 mM
Lactato de Na	21,6 mM	10 mM	10 mM
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2 mM	2 mM	2 mM
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,4 mM	0,5 mM	0,5 mM
HEPES	10 mM	-	10 mM
Rojo fenol	-	0,028 mM	0,027 mM
Piruvato de Sodio	1 mM	0,2 mM	0,2 mM
BSA	-	-	3 mg/ml
BSA, Fracción V	3 mg/ml	3 mg/ml	-
Heparina	5 µg/ml	5 µg/ml	-
Gentamicina	50 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml



**Anexo 7.** Composición del medio de mantenimiento de ovocitos post-ICSI.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Cantidad</b>
TCM-199	-	9 ml
FBS	10%	1 ml
HEPES	12 mM	0,028596 g

**Anexo 8.** Composición del medio de activación con etanol.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Cantidad</b>
TCM-199	-	8,3 ml
FBS	10%	1 ml
HEPES	12 mM	0,028596 g
Etanol-Abs	7 %	0,7 ml

**Anexo 9.** Composición del medio de activación con ionomicina.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Cantidad</b>
TCM-199	-	9 ml
FBS	10%	1 ml
HEPES	12 mM	0,028596 g
Ionomicina*	5 $\mu$ M	50 $\mu$ l

\* Solución de stock

**Anexo 10.** Composición del medio de activación con 6-DMAP.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Cantidad</b>
TCM-199	-	9 ml
FBS	10%	1 ml
HEPES	12 mM	0,028596 g
6-DMAP*	1,9 mM	100 $\mu$ l

\* Solución de stock

**Anexo 11.** Composición del medio de activación con SrCl<sub>2</sub>.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Cantidad</b>
TCM-199	-	9 ml
FBS	10%	1 ml
HEPES	12 mM	0,028596 g
SrCl <sub>2</sub> *	10 mM	100 µl

\* Solución de stock

**Anexo 12.** Composición del medio de cultivo SOFaa.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Cantidad</b>
SOF - BASE	-	10 ml
Aminoácidos esenciales	50x	200 µl
Aminoácidos no esenciales	100x	100 µl
EGF	10 ng/mL	5 µl
SFB	2%	200 µl
Myoinositol*	0,5 mg/ml	100 µl
Piruvato de sodio*	0,4 mM	40 µl
L-Glutamina*	29,2 µg/mL	20 µl
Ácido cítrico*	0,1 mg/ml	10 µl
BSA-FAC-V	3 mg/ml	0,03 g
Gentamicina 10 mg/ml	50 µg/ml	50 µl

\* Soluciones de stock

**Anexo 13.** Flujograma de recuperación de espermatozoides de alpaca a partir de epidídimos de testículos procedentes del matadero.



Testículos provenientes del matadero



Eliminación de las capas de los testículos



Recepción de espermatozoides en la solución dilutora AndroMed®



Corte en la *cauda* del epidídimo



Observación de la motilidad espermática

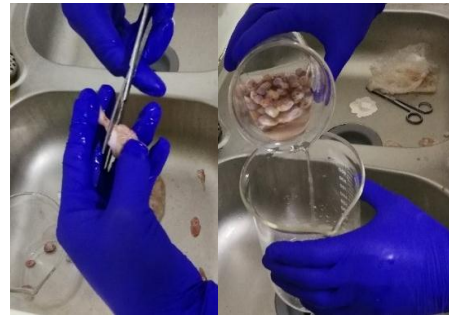


Almacenamiento de los espermatozoides en refrigeración

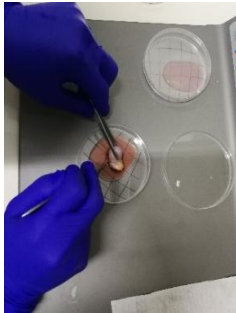
**Anexo 14.** Flujograma de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca.



Acondicionamiento de ovarios en Baño María a 37 °C



Eliminación de tejidos circundantes y lavado de ovarios



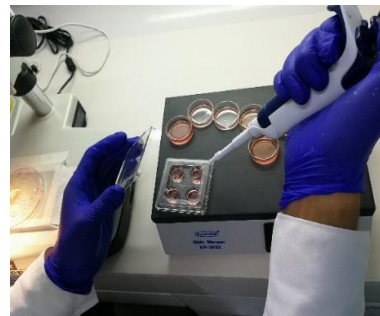
Recuperación de los COCs con la técnica de *Slicing*



Incubación durante 30 h a 38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa



Selección de los COCs según calidad (I, II, III y IV)

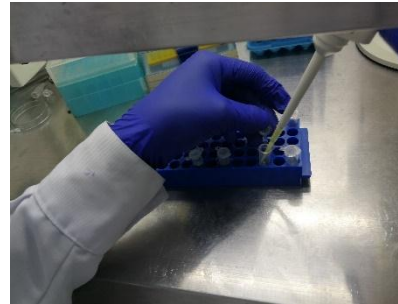


Distribución al azar de los (I, II y III) en el medio de maduración

## Anexo 15. Selección y capacitación de los espermatozoides.



Centrifugación por 3 min a 307 x g, se toma 100  $\mu$ l del sedimento y se coloca en 1 ml de sp-TALP y se centrifuga nuevamente a 307 x g por 3 min



Se coloca 100  $\mu$ l de semen diluido a 1 ml de sp-TALP



Tomar 40  $\mu$ l de sedimento y depositar en el fondo del tubo Eppendorf que contiene 400  $\mu$ l de sp-TALP e incubar por 1 h a 38,5 °C



Espermatozoides seleccionados y capacitados



Observación de la motilidad en el microscopio

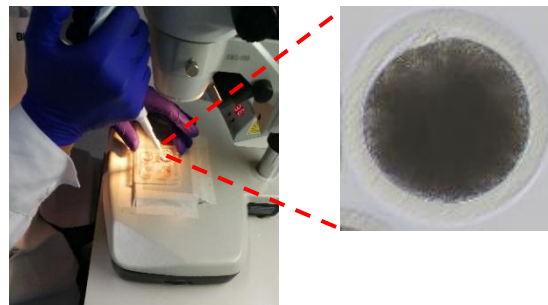
**Anexo 16.** Flujograma de denudación de ovocitos y preparación de los ovocitos para la fecundación por ICSI.



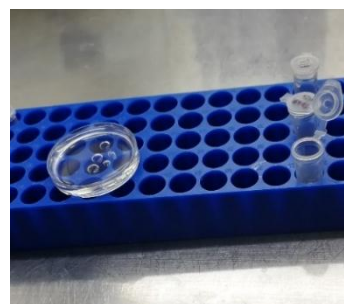
Expansión de las células de cumulus



Denudación de ovocitos en hialuronidasa



Búsqueda de ovocitos maduros (MII)



Armado de la placa de inyección de los ovocitos



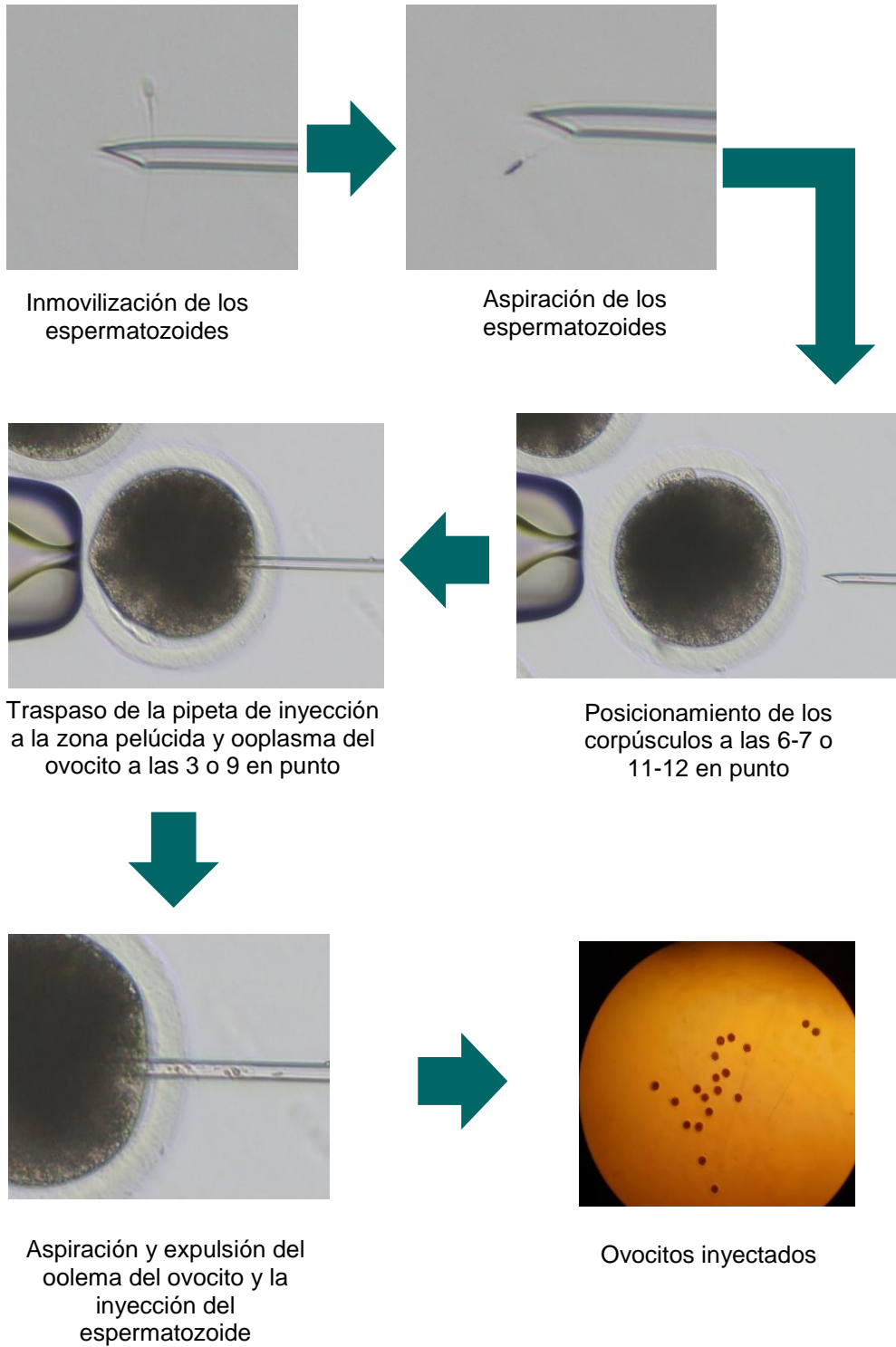
*Swim up*



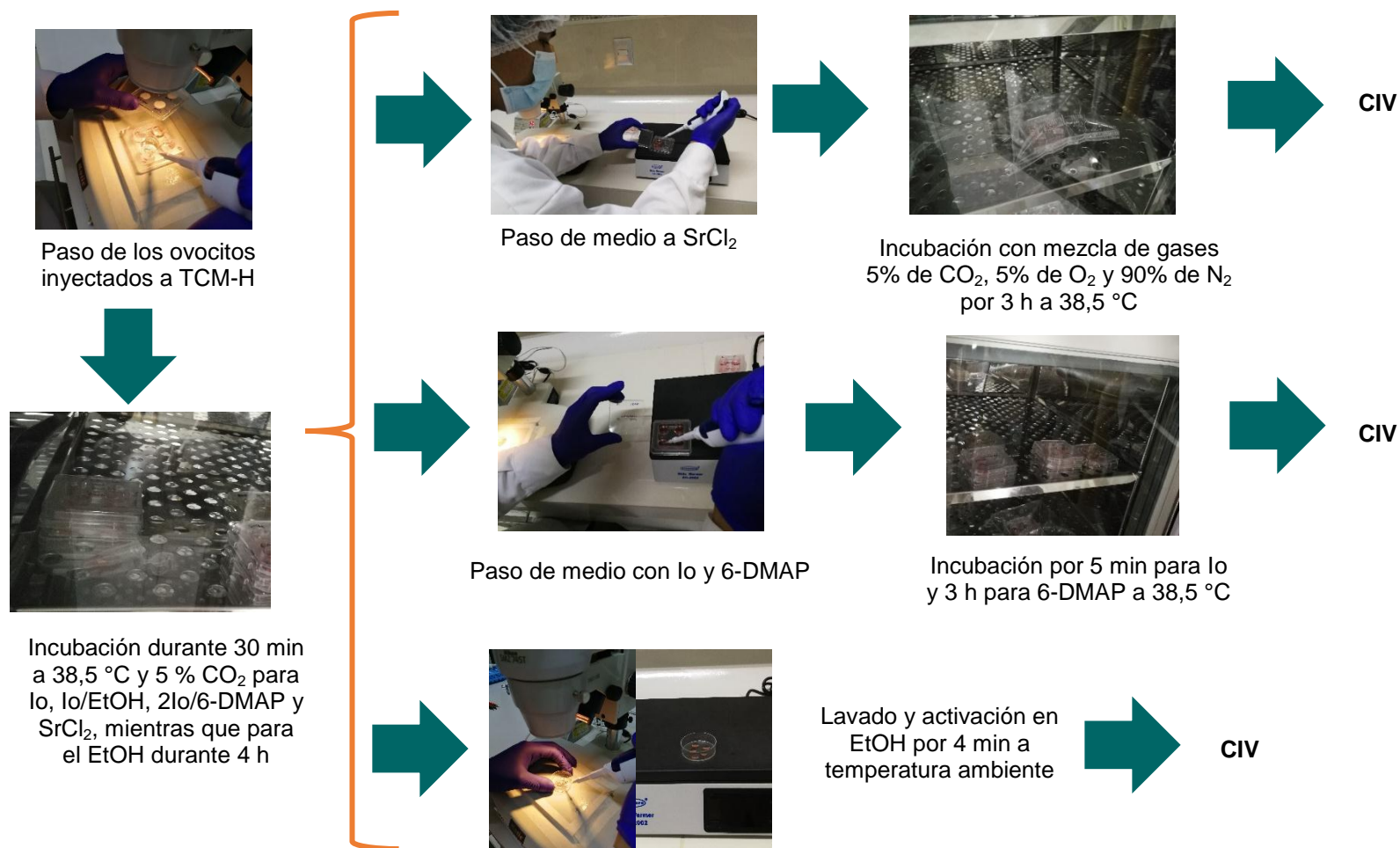
Inyección de ovocitos con espermatozoides seleccionados y capacitados



**Anexo 17.** Flujograma de fecundación *in vitro* por inyección intracitoplasmática de espermatozoides (FIV- ICSI) de ovocitos de alpaca.



### Anexo 18. Flujo de activación de ovocitos post-ICSI.





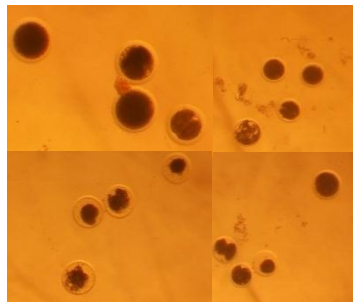
**Anexo 19.** Flujograma de cultivo *in vitro* de ovocitos ICSI.



Lavado y paso al medio de cultivo *in vitro*



Llenado de mezcla de gases 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 90% de N<sub>2</sub>

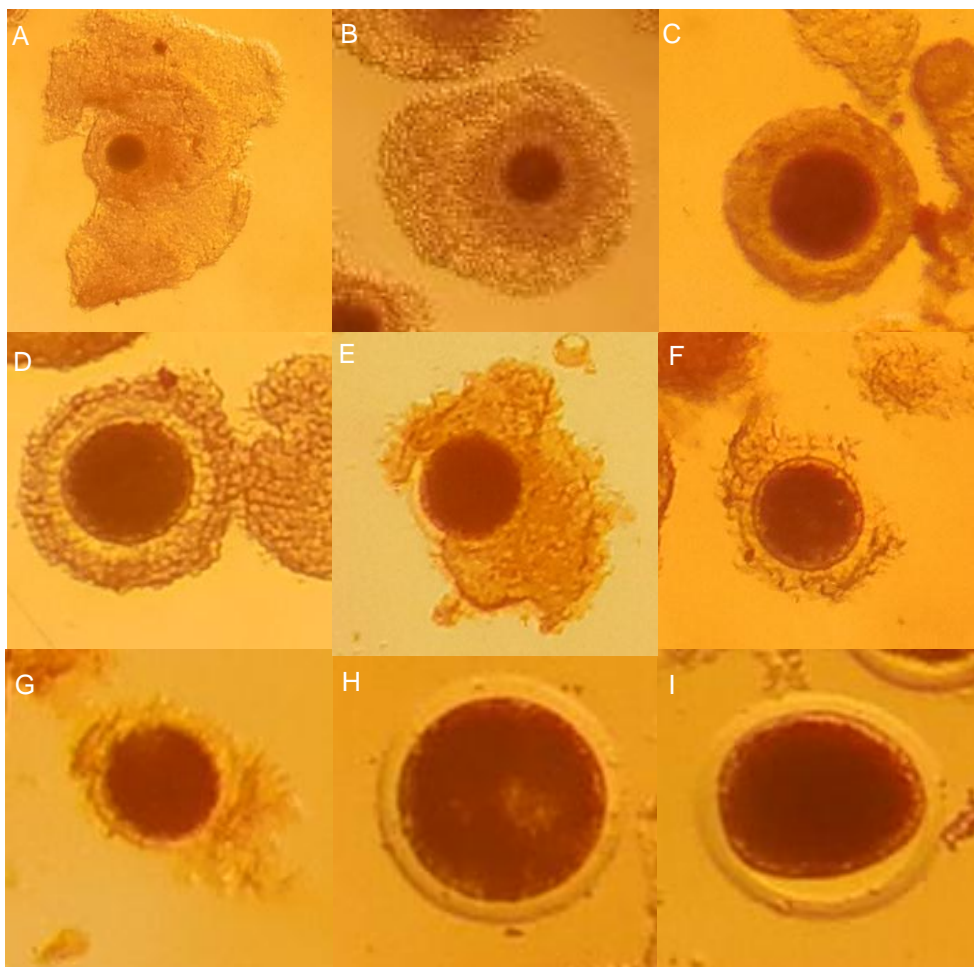


Evaluación de los estadios de desarrollo embrionario



Incubación a 38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa durante 5 días

**Anexo 20.** Calidad de los ovocitos de alpaca según morfología. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho.



Categoría I (A-B): COCs con cúmulos de capas múltiples (>5 capas), compacto y citoplasma homogéneo; Categoría II (C-E): COCs parcialmente rodeados por células del cúmulo (entre 2-4 capas), y con citoplasma homogéneo; Categoría III (F-G) COCs con cúmulo  $\leq$  1 capa de granulosa o en partes desnudos y citoplasma variado; Categoría IV (H-I): ovocitos desnudos rodeados por su zona pelúcida y con citoplasma granular.

**Anexo 21.** Prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (Bartlett) en el clivaje, estadios y calidad embrionaria,  $p < 0,05$ .

Parámetros	Shapiro-Wilk	Prueba de Bartlett
	sig.	sig.
Clivaje	0,09776	0,5131
Mórula	0,3698	0,2284
Blastocisto	0,6537	0,07876
Excelente	0,1415	2,2e-16 *
Bueno	0,0891	0,7194
Regular	0,328	0,6888
Malo	0,003041 *	2,2e-16 *

\* indica significancia en la prueba de normalidad y homogeneidad de varianza ( $p < 0,05$ )

**Anexo 22.** Análisis de varianza de las medias porcentuales del desarrollo (Clivaje, mórula y blastocisto) y calidad embrionaria (bueno y regular) en alpacas,  $p < 0,05$ .

Parámetros	Análisis de varianza
	sig.
Clivaje	0,00892 *
Mórula	0,01051 *
Blastocisto	0,1845
Bueno	0,02199 *
Regular	0,7397

\* indica significancia en el análisis de varianza ( $p < 0,05$ )

**Anexo 23.** Comparación múltiple de Duncan para el clivaje en alpaca con un nivel de significancia de 95 %, ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	Medias	n	
lo/EtOH	90,0	4	A
EtOH	86,7	4	AB
lo	80,4	4	AB
2lo/6-DMAP	58,8	4	ABC
Control	55,0	4	BC
SrCl <sub>2</sub>	35,0	4	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Anexo 24.** Comparación múltiple de Duncan en el estadio de mórula con un nivel de significancia de 95 %, ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	Medias	n	
Io	59,23	4	A
EtOH	59,17	4	A
Io/EtOH	50,84	4	A
2Io/6-DMAP	43,33	4	A
Control	37,50	4	AB
SrCl <sub>2</sub>	15,00	4	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Anexo 25.** Prueba de kruskal wallis para la calidad embrionaria (excelente) con un nivel de confianza de 95 %, ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	p
Io/EtOH	4	0,00	0,0	0,0	0,1985
EtOH	4	5,00	10,0	0,0	
Io	4	13,99	10,4	15,5	
2Io/6-DMAP	4	12,50	14,4	12,5	
Control	4	16,25	19,7	12,5	
SrCl <sub>2</sub>	4	0,00	0,0	0,0	

**Anexo 26.** Comparación múltiple de Duncan para la calidad embrionaria (buena), con un nivel de confianza de 95 %, ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	Medias	n	
EtOH	54,17	4	A
Io	46,73	4	AB
Io/EtOH	44,59	4	ABC
Control	22,50	4	BCD
SrCl <sub>2</sub>	15,00	4	CD
2Io/6-DMAP	11,25	4	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Anexo 27.** Prueba de kruskal wallis para la calidad embrionaria (malo), con un nivel de confianza de 95 %, ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	p
2I0/6-DMAP	4	23,75	20,6	22,5	0,0445
SrCl <sub>2</sub>	4	15,00	10,0	20,0	
I0/EtOH	4	18,33	21,3	16,7	
EtOH	4	0,00	0,0	0,0	
I0	4	0,00	0,0	0,0	
Control	4	0,00	0,0	0,0	

**Anexo 28.** Prueba de rangos para la calidad embrionaria (malo), con un nivel de confianza de 95 %, ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	Medias	Rangos	
2I0/6-DMAP	23,75	18,0	A
SrCl <sub>2</sub>	15,00	16,0	A
I0/EtOH	18,33	15,5	A
EtOH	0,00	8,5	A
I0	0,00	8,5	A
Control	0,00	8,5	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Anexo 29. Matriz de consistencia.

PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
¿Cuál será el efecto de los activadores químicos post-activadores químicos post-ICSI sobre el desarrollo embrionario en <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”?	<p><b>OBJETIVO GENERAL</b></p> <p>Evaluar el efecto de los activadores químicos post-ICSI sobre el desarrollo embrionario en <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”.</p> <p><b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Determinar el mejor activador para lograr la mayor tasa en el estadio de desarrollo en ovocitos post-ICSI en <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”.</li> <li>• Determinar el mejor activador en la calidad de los embriones expuestos a los activadores químicos post-ICSI en <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”.</li> </ul>	<p><b>ANTECEDENTES BASES TEÓRICAS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proceso de fecundación de ovocitos</li> <li>• Activación de ovocitos</li> <li>• Regulación del ciclo de calcio en la activación</li> <li>• Activación artificial de ovocitos</li> <li>• Activación química de ovocitos</li> <li>• Activación con agentes de transición única y oscilación de <math>Ca^{2+}</math></li> <li>• Activación con agentes independientes de <math>Ca^{2+}</math></li> <li>• Producción <i>in vitro</i> de embriones</li> <li>• Maduración <i>in vitro</i></li> <li>• Fertilización <i>in vitro</i></li> <li>• Cultivo <i>in vitro</i></li> </ul>	<p>Existen diferentes efectos de los activadores químicos post-ICSI (EtOH, Ionomicina, 6-DMAP y <math>SrCl_2</math>), siendo estos los que determinan el aumento del nivel de calcio intracelular e inhibición de la fosforilación de proteínas que son necesarios para la activación y ocasionando diversos efectos sobre los estadios de desarrollo y calidad embrionaria en <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”.</p>	<p><b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b></p> <p>Activadores químicos</p> <p><b>INDICADORES</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Etanol 7%</li> <li>• Ionomicina 5 <math>\mu</math>M</li> <li>• Ionomicina 5 <math>\mu</math>M / Etanol 7%</li> <li>• Ionomicina 5 <math>\mu</math>M / 6-DMAP 1,2 mM</li> <li>• Cloruro de estroncio (<math>SrCl_2</math>) 10 mM</li> </ul> <p><b>VARIABLE DEPENDIENTE</b></p> <p>Desarrollo embrionario</p> <p><b>INDICADORES</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Embriones (Estadios de desarrollo)</li> <li>• Calidad embriones (Grado embrionario)</li> </ul>	<p><b>1. TIPO DE INVESTIGACIÓN</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Básico</li> </ul> <p><b>2. NIVEL DE INVESTIGACIÓN</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Experimental</li> </ul> <p><b>3. MÉTODO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Experimental</li> <li>• Comparativo</li> </ul> <p><b>4. DISEÑO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Experimental</li> </ul> <p><b>5. POBLACIÓN</b></p> <p>Ovocitos en metafase II de alpaca</p> <p><b>6. MUESTRA</b></p> <p>115 ovocitos en metafase II microinyectados con un espermatozoide</p> <p><b>7. TÉCNICAS.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Observación</li> </ul> <p><b>8. INSTRUMENTO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Microscopio</li> <li>• Estereoscopio</li> <li>• Micromanipulador</li> <li>• Incubadora de <math>CO_2</math></li> <li>• Equipos y otros</li> </ul>