

Rev Inv Vet Perú 2014; 25(4): 468-476
<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10782>

Evaluación de Cuatro Tiempos de Cultivo sobre la Tasa de Maduración y División Posfecundación *in vitro* de Ovocitos de Alpaca

EFFECT OF TIME OF INCUBATION ON NUCLEAR MATURATION AND CLEAVAGE POST *IN VITRO* FERTILIZATION OF ALPACA OOCYTES

Wilfredo Huanca L.^{1,3}, Rosario Condori P.¹, María Chileno M.¹, Pedro García H.², Juan Cainzo C.², Juan J. Becerra G.²

RESUMEN

Se evaluó el efecto del tiempo de cultivo sobre la tasa de maduración nuclear y tasa de división posfecundación a 72 horas de ovocitos de alpacas. Complejos Cumulus-Ovocitos (CCOs) fueron obtenidos de ovarios procedentes de animales beneficiados en el camal y transportados a 35 °C en solución salina 0.9% suplementada con antibiótico antimicótico. Los CCOs fueron aspirados de folículos de 2 a 6 mm. *Experimento 1*: 502 ovocitos fueron distribuidos en cuatro tiempos de maduración (30, 34, 38 y 42 horas) y madurados en TCM-199 suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), 0.5 µg/mL de FSH, 10 µg/mL de hCG, 0.2 mM de piruvato de sodio, 50 µg/mL de gentamicina y 1 µg/mL de E2, y cultivados a 39 °C bajo una atmósfera de 5% de CO₂ y alta humedad. Posteriormente, los ovocitos fueron removidos, lavados con PBS suplementado con 10% de SFB y 1 mg/ml de hialuronidasa y fijados en solución de etanol y ácido acético (3:1). Los ovocitos fueron colocados en portaobjetos, teñidos con 1% de orceína y examinados bajo un microscopio a 400x para determinar la maduración nuclear. *Experimento 2*: 533 ovocitos fueron cultivados bajo las mismas condiciones del experimento 1 y fecundados con espermatozoides obtenidos de epidídimos. Los espermatozoides fueron centrifugados a 700 g en un gradiente de Percoll discontinua (22.5:45%) por 25 minutos. El sobrenadante fue removido y el pellet (con espermatozoides viables) reconstituido con TL-Stock. Los gametos fueron co-cultivados por 18 horas a 39 °C con 5% de CO₂ en KSOM suplementado con 10% de SFB, 2 mM de piruvato de sodio y 50 µg/mL gentamicina, y evaluados

¹ Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² Departamento de Patología Animal, Unidad de Reproducción Animal, Universidad Santiago de Compostela, España

³ E-mail: whuanca2002@yahoo.com

Recibido: 7 de noviembre de 2013

Aceptado para publicación: 28 de agosto de 2014

a las 72 horas. En el Experimento 1 se obtuvo el 26.3±5.4, 52.6±6.7, 68.5±10.6 y 75.3±11.9% de ovocitos en Metafase-II para 30, 34, 38 y 42 h de cultivo, respectivamente, con diferencia estadística entre 30 y 34 h respecto a 38 y 42 h ($p<0.05$). En el Experimento 2, la tasa de división fue 9.5±4.8, 8.1±5.8, 15.6±9.2 y 19.8±8.0% para 30, 34, 38 y 42 h, sin diferencia estadística entre grupos. Los resultados sugieren que los ovocitos de alpacas requieren de 38 a 42 h de maduración para obtener estadios de Metafase-II.

Palabras clave: fecundación *in vitro*, ovocitos, maduración, alpacas

ABSTRACT

The study was carried out to evaluate the effect of incubation time on nuclear maturation and cleavage rate of alpaca oocytes after 72 hours post-fertilization. Cumulus-oocyte complexes (CCOs) were collected from ovaries collected at slaughterhouse and transported in saline solution 0.9% with antibiotic antimycotic at 35 °C. CCOs were aspirated from 2-6 mm follicles. *Experiment 1:* 502 oocytes were distributed in four maturation times (30, 34, 38, 42 hours), matured in TCM-199 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (v:v), 0.5 µg/mL FSH, 10 µg/mL hCG, 0.2 mM sodium pyruvate, 50 µg/mL gentamicine and 1 µg/mL oestradiol, and cultivated at 39 °C in an atmosphere of 5% CO₂ and high humidity. After maturation, CCOs were removed from maturation medium and washed with PBS supplemented with 10% FCS and 1 mg/ml of hyaluronidase, and fixed in ethanol and acetic acid (3:1). Oocytes were placed on a glass slide, stained with 1% orcein and examined under microscope at 400x to evaluate nuclear maturation status. *Experiment 2:* 533 CCOs were culture under similar maturation protocols than experiment 1 and fertilized with epididymal spermatozoa. These were obtained by centrifugation at 700 g on a Percoll discontinuous gradient (22.5:45%) for 25 min. The supernatant was removed by aspiration and the pellet (containing viable spermatozoa) was re-suspended in TL Stock. ~~Gametes were co-incubated for 18 h at 39 °C with 5% CO₂~~ and cultivated in KSOM supplemented with 10% FCS (v:v), 0.2 mM sodium pyruvate and 50 µg/ml gentamicine, and evaluated in 72 hours. In experiment 1, 26.3±5.4, 52.6±6.7, 68.5±10.6 and 75.3±11.9% of oocytes were in M-II stage for the 30, 34, 38, and 42 h of culture respectively, with significant difference between 30 and 34 with respect to 38 and 42 h ($p<0.05$). In experiment 2, the cleavage rate was 9.5±4.8, 8.1±5.8, 15.6±9.2 and 19.8±8.0% for 30, 34, 38, and 42 h after culture, and without statistical difference between groups. These results indicate that is required 38-42 h for the maturation of alpaca oocytes.

Key words: *in vitro* fertilization, oocytes, maturation, alpaca

INTRODUCCIÓN

El conocimiento sobre la fisiología y endocrinología reproductiva de las especies domésticas ha tenido un incremento sustancial en los últimos años y ha contribuido al desarrollo de procedimientos biotecnológicos aplicados a las distintas especies (Kruip y Van Reenen, 2001). El desarrollo de la técnica de fecundación *in vitro* (FIV) ha sido el resulta-

do de investigaciones sobre los factores involucrados en la maduración del ovocito, la capacitación del espermatozoide y el posterior desarrollo embrionario (Brackett *et al.*, 1982).

La aplicación de tecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos se ha incrementado en la última década (Miragaya *et al.*, 2006). El conocimiento de la biología reproductiva de los camélidos ha contribuido

a su desarrollo y aplicación, aunque en forma limitada y referidas principalmente a la técnica de inseminación artificial con semen fresco (Huanca y Adams, 2007), sincronización y estimulación de la onda folicular (Ratto *et al.*, 2003), y desarrollo de protocolos de estimulación ovárica y transferencia de embriones (Huanca *et al.*, 2009); habiéndose reportado experiencias preliminares sobre maduración y FIV en llamas (Del Campo *et al.*, 1994; Miragaya *et al.*, 2006; Conde *et al.*, 2007; Berland *et al.*, 2011; Trasorras *et al.*, 2013), quedando por realizar estos trabajos en la alpaca.

La maduración del núcleo del ovocito es un proceso que le permite reducir la carga cromosómica de la especie a la mitad, convirtiéndose en una célula haploide. Al inicio de la maduración, el núcleo del ovocito primario se encuentra bloqueado en la profase de diploteno de la primera división meiótica, estadio de vesícula germinal (GV). En la madurez del folículo y en respuesta a la elevación preovulatoria de la LH, el ovocito reinicia la división meiótica (Gordon, 1994). El núcleo del ovocito entra en diacinesis, y al final de la profase I se disgrega la envoltura nuclear y ocurre la ruptura de la vesícula germinal. Al mismo tiempo se produce una polimerización de los microtúbulos, desaparecen los nucléolos y los cromosomas se condensan y se orientan formando el huso acromático correspondiente a la metafase I. Posteriormente, se separan los cromosomas homólogos, se produce la extrusión del primer corpúsculo polar, y se origina el ovocito secundario con un solo par de cromosomas.

A diferencia de la profase I, que es muy larga, la profase II, prácticamente no existe y el ovocito secundario comienza la segunda división meiótica, entrando directamente a la metafase II, donde la meiosis se interrumpe nuevamente (segundo bloqueo) y el ovocito es expulsado del ovario durante la ovulación. La segunda división meiótica termina cuando el ovocito es penetrado por un espermatozoide y se produce la extrusión del segundo corpúsculo polar.

Los ovocitos de los camélidos presentan características propias, con un citoplasma oscuro, atribuido a la presencia de gotas de lípidos (Del Campo, 1994, citado por Ratto *et al.*, 2005).

La limitada información existente sobre el desarrollo de protocolos de FIV en camélidos domésticos sugiere, en una primera fase, estudiar y evaluar los factores que contribuyan a obtener resultados similares a los observados en otras especies de interés económico. El presente estudio fue realizado con el propósito de evaluar los tiempos de maduración requeridos para obtener ovocitos en estadios de Metafase II (MII) y determinar la tasa de división de ovocitos madurados y fecundados a las 72 horas post fecundación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, y la lectura de las muestras fijadas se realizó en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, España.

Se colectaron ovarios de alpacas adultas, sacrificadas en el camal municipal del distrito de Nuñoa, Puno, situado a 4000 msnm. Los ovarios se colocaron en un termo conteniendo solución salina 0.9% (NaCl) + antibiótico antimicótico, a 37 °C, y fueron transportados al laboratorio dentro de las 8 a 10 horas siguientes. Los complejos cumulus-ovocitos (CCOs) fueron aspirados de folículos con diámetro de 2-6 mm, con ayuda de una jeringa de 10 ml estéril y aguja 18G 1½". El líquido folicular obtenido se depositó en un tubo Falcon de 50 ml cubierto con papel aluminio, y se le dejó reposar por 15 minutos. Luego, el sedimento fue aspirado y colocado en una placa Petri (90 x 15 mm) mantenida a 37 °C, para facilitar la búsqueda de CCOs con la ayuda de un estereomicroscopio a 40x.

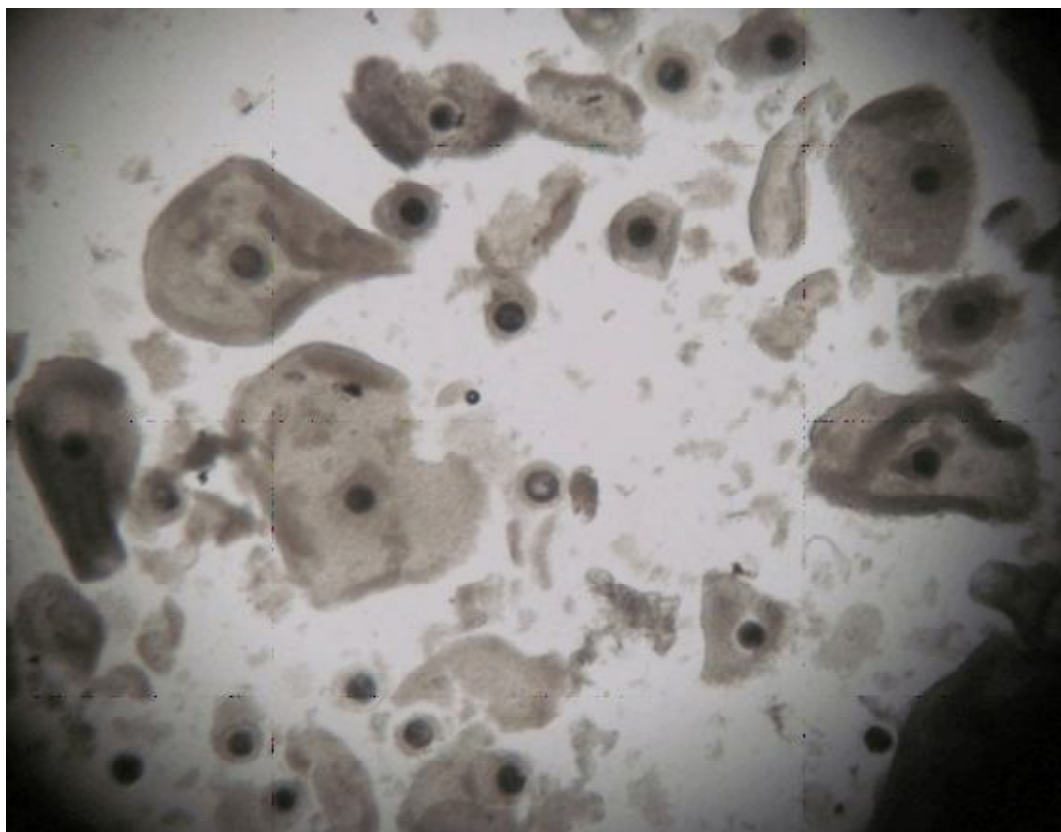


Figura 1. Ovocitos inmaduros de alpaca de grado 1 y 2, según Bertoldo *et al.* (2010)

Los ovocitos fueron clasificados en base a los criterios señalados por Bertoldo *et al.* (2010), usando un sistema subjetivo de evaluación que incluye cuatro grados. En el estudio se utilizaron únicamente ovocitos de grado 1 y 2 (Fig. 1). Los grados fueron:

- 1: CCOs con más de tres capas de células del cúmulo compactas y un citoplasma homogéneo.
- 2: CCOs con 2 a 3 capas de células del cúmulo compactas y un citoplasma homogéneo.
- 3: CCOs parcial o totalmente desnudados, con citoplasma heterogéneo, con presencia de vacuolas.
- 4: CCOs con células del cúmulos expandido.

Experimento 1: Maduración *in vitro*

En la evaluación de la tasa de maduración se utilizaron 502 ovocitos, obtenidos en cinco repeticiones. La maduración se hizo en medio TCM-199, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de FSH, 10 $\mu\text{g/ml}$ de hCG, 0.2 mM de piruvato de sodio, 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina y 1 $\mu\text{g/ml}$ de estradiol, según la siguiente distribución: Tratamiento 1 (n=118): 30 horas; Tratamiento 2 (n=138): 34 horas; Tratamiento 3 (n=125): 38 horas; Tratamiento 4 (n=121): 42 horas.

El medio TCM-199 fue colocado en placas Petri en microgotas de 40 μl , cubiertas con aceite mineral y colocado en incubadora de CO_2 por lo menos dos horas antes de su uso. Los ovocitos se lavaron tres veces en

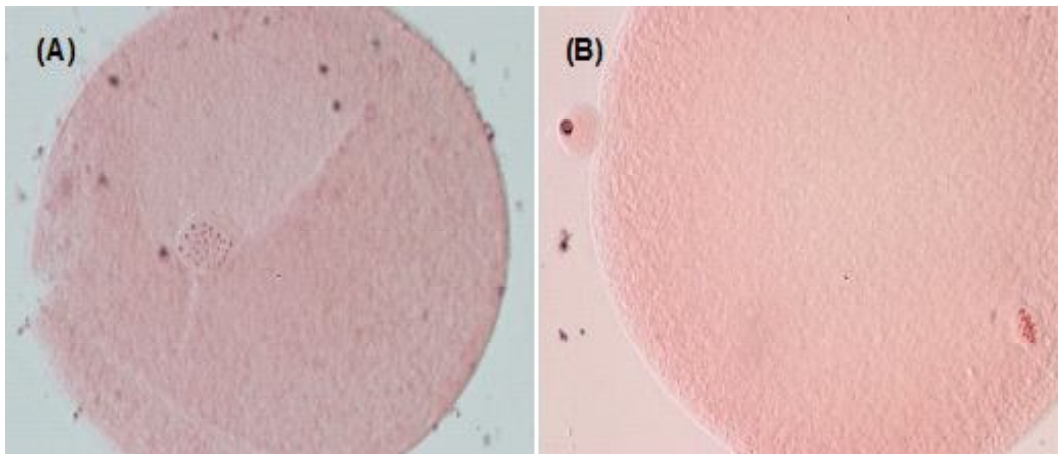


Figura 2. Ovocitos de alpaca en meiosis. A) Estadio Metafase I; B) Estadio Metafase II

medio de lavado pre-maduración y luego, se colocaron 20 ovocitos por gota. La maduración *in vitro* se realizó en incubadora de CO₂, a 39 °C, 5% de CO₂ y humedad relativa alta, considerando los tiempos de cultivo para cada tratamiento.

Luego de la incubación, los ovocitos fueron colocados en solución PBS suplementada con 10% de SFB y 1 mg/ml de hialuronidasa. Se eliminaron las células del cúmulo mediante agitación en vortex a 2000 rpm por 5 minutos. Los ovocitos desnudos fueron colocados en una solución de fijación conteniendo etanol y ácido acético (3:1), y almacenados a 4 °C en refrigeración hasta su evaluación.

Para la tinción, se colocaron 5 a 10 ovocitos por lámina, cubiertos con un cubreobjeto sujeto en las cuatro puntas con una mezcla de parafina y vaselina (1:1). Se ejerció una ligera presión sobre el cubreobjetos hasta entrar en contacto con los ovocitos, evitando dañarlos. Se agregó la tinción de orceína al 1% durante 2-3 minutos, permitiendo que la solución penetre entre el porta y el cubreobjetos por capilaridad. Finalmente, las láminas fueron selladas con esmalte y con ayuda de un microscopio

(400x) se determinaron los estadios de maduración nuclear de los ovocitos, considerándose vesícula germinal (GV), metafase I (MI) (Fig. 2a), anafase-telofase I, metafase II (MII) (Fig. 2b), y degenerados.

Experimento 2: Fecundación *in vitro*

En la evaluación de la tasa de división a las 72 horas posfecundación se utilizaron 533 ovocitos, obtenidos de cuatro repeticiones. Los ovocitos fueron sometidos a los mismos tiempos de maduración del experimento 1 y fecundados con espermatozoides obtenidos de epidídimos de machos beneficiados en el camal. Luego de cumplirse cada tiempo de maduración, se procedió a retirar y lavar los ovocitos por tres veces. Posteriormente, se colocaron 20 ovocitos por cada gota del medio de fecundación y fueron mantenidos en la incubadora de CO₂ a 39 °C por 1 h previo a la adición de los espermatozoides.

Los espermatozoides fueron colocados en una gradiente discontinua de Percoll 22.5/45% y sometida a centrifugación a 700 g por 25 minutos (Abdoon 2001; Khatir *et al.*, 2004). Se retiró el sobrenadante y el pellet formado en la base del tubo fue reconstituido con 30 µl de solución TL-Stock.

A cada gota del medio de fecundación con los 20 ovocitos, se agregó 2 μ l de la suspensión de espermatozoides, 2 μ l de heparina (1 mg/ml) y 2 μ l de PHE (2 mM Penicilamina, 1 mM Hipotaurina y 250 mM Epinefrina). Se hizo un co-cultivo por 18 horas a 39 °C, 5% de CO₂ y bajo condiciones de máxima humedad. El cultivo *in vitro* se realizó en medio KSOM-AA, suplementado con 10% de SFB, 2 mM de piruvato de sodio y 50 μ g/mL de gentamicina, preparado en gotas de 30 μ l, sumergidas en aceite mineral y mantenido en incubadora de CO₂, por lo menos 12 horas antes de su uso.

Al término del co-cultivo, los presuntos cigotos fueron retirados y se procedió a eliminar las células del cúmulo mediante agitación en vortex a 2000 rpm por 2 min. Se colocó 20 cigotos por gota. La división de células (2 a 8) fue observada a las 72 horas post-fecundación (Khatir *et al.*, 2007a).

Análisis Estadístico

El efecto de los tratamientos (tiempos de maduración) sobre los porcentajes de maduración de ovocitos y división post-fecundación fueron analizados mediante análisis de varianza, con el programa estadístico STATA v. 10.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El desarrollo de la tecnología de FIV requiere reducir el tiempo necesario para la maduración nuclear observada en condiciones *in vivo*. En bovinos y ovinos, se requiere 24 horas para la maduración *in vitro* para obtener un porcentaje superior al 85% de ovocitos madurados en estadios de Metafase II (van den Hurk *et al.*, 2005), mientras que en la cerda se requiere de 40 horas para obtener más del 75% de ovocitos maduros en Metafase II (van den Hurk *et al.*, 2005). En el Cuadro 1 se observa porcentajes decrecientes de ovocitos en Metafase I y una frecuencia creciente de ovocitos de estadios en

Metafase II conforme aumenta el tiempo de maduración. Los porcentajes de ovocitos en estadios de Metafase II más altos se obtuvieron en los tratamientos 3 y 4 con 68.5 y 75.3%, respectivamente ($p < 0.05$).

Existen pocos estudios en camélidos sudamericanos sobre FIV y los resultados obtenidos en el presente estudio no pueden ser comparados con reportes previos. Se dispone de un estudio en llamas donde se obtuvo 30.4% de maduración (ovocitos en Metafase II) después de 30 horas de cultivo (Del Campo *et al.*, 1994), pero el objetivo no fue la determinación del tiempo de maduración, sino que estuvo orientado a demostrar la factibilidad de desarrollar un protocolo de fecundación *in vitro* en camélidos, así como determinar la capacidad fecundante de espermatozoides obtenidos de epidídimos, que sirvan como base para el desarrollo de protocolos de FIV. En otro estudio se obtuvo 78% de ovocitos en estadio de Metafase II con un tiempo de maduración *in vitro* de 28 horas (Ratto *et al.*, 2005); sin embargo, en dicho estudio se utilizaron tratamientos hormonales previos para inducir el crecimiento folicular, contribuyendo a la maduración *in vivo* de los ovocitos.

La necesidad de un tiempo de maduración prolongado en los camélidos podría ser explicado por las características propias de la especie, toda vez que son especies de ovulación inducida, que requieren de estímulos externos como la cópula y que la ovulación *in vivo* ocurre a las 30 horas posteriores a la aplicación del estímulo (Huanca *et al.*, 2001).

Estudios realizados en una especie similar, el dromedario, señalan que los ovocitos requieren un tiempo óptimo de maduración *in vitro* de 36 horas, siendo el rango de 32 a 44 horas para obtener porcentajes mayores a 75% de ovocitos madurados en estadios de Metafase II (Abdoon, 2001; Khatir *et al.*, 2004, 2007a,b; Wani y Nowshari, 2005). Estos resultados, así como el porcentaje creciente de ovocitos degenerados conforme se

Cuadro 1. Tasa porcentual de maduración nuclear (Metafase II¹) de ovocitos de alpacas

Tiempo de maduración	Vesícula germinal	Metafase I	Anafase-telofase	Metafase II	Degenerado
T1 (n=118)	5.3 ± 1.3	43.8 ± 11.7	9.0 ± 13.9	26.3 ^a ± 5.4	15.6 ± 9.9
T2 (n=138)	10.6 ± 7.1	23.1 ± 8.72	12.4 ± 8.0	52.6 ^b ± 6.7	1.4 ± 3.2
T3 (n=125)	6.1 ± 6.3	7.9 ± 3.3	12.6 ± 5.6	68.5 ^{b,c} ± 10.6	4.8 ± 3.9
T4 (n=121)	0	9.9 ± 10.4	2.3 ± 2.2	75.3 ^c ± 11.9	12.4 ± 9.5

T1: 30; T2: 34; T3: 38; T4: 42 horas

^{a,b,c} Superíndices diferentes en el estadio de Metafase II son estadísticamente diferentes (p<0.05)¹ Estadio de maduración nuclear

Cuadro 2. Tasa porcentual de división de ovocitos de alpacas posfecundación a diferentes horas de maduración nuclear

Tiempo de maduración de ovocitos	Ovocitos (n)	Porcentaje de división a las 72 horas
T1 (30 h)	131	9.5 ± 4.8
T2 (34 h)	122	8.1 ± 5.8
T3 (38 h)	139	15.6 ± 9.2
T4 (42 h)	141	19.8 ± 8.0

¹ Sin diferencia estadística entre tratamientos

incrementa los tiempos de maduración concuerdan con los del presente estudio. El incremento en la frecuencia de ovocitos degenerados puede ser explicado en parte por las condiciones en que se realiza el cultivo, donde se utilizan concentraciones de oxígeno de 20%, con la consiguiente generación de sustancias oxígeno reactivas (ROS). Sin embargo, no se han encontrado posibles explicaciones al 15.6% de ovocitos degenerados con 30 horas de maduración.

Los resultados de división de ovocitos posfecundación a diferentes tiempos de maduración se observan en el Cuadro 2. Se puede observar una tendencia al aumento en tasa de división de ovocitos conforme aumenta el tiempo de maduración, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, dada la gran variabilidad de los promedios. Por otro lado, los resultados fueron bastante bajos, especialmente si se compara con los resultados obtenidos en camellos. Sin

embargo, es posible que estas diferencias se deban a posibles deficiencias en la implementación de la técnica, especialmente en las condiciones de fecundación y cultivo posfecundación.

CONCLUSIONES

- El tiempo de maduración *in vitro* de ovocitos procedentes de ovarios de alpacas beneficiadas en camal se encuentra en un rango de 38 y 42 horas, para obtener 68.5 y 75.3% de ovocitos en Metafase II, respectivamente.
- La tasa de división de ovocitos fecundados *in vitro*, con espermatozoides obtenidos directamente de epidídimo de machos beneficiados en camal, fue de 15.6 y 19.8% para las 38 y 42 horas de maduración, respectivamente.

LITERATURA CITADA

1. **Abdoon ASS. 2001.** Factors affecting follicular population, oocyte yield and quality in camels (*Camelus dromedarius*) ovary with special reference to maturation time *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 66: 71-79. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.047
2. **Berland MA, Von Baer A, Ruiz J, Parraguez VH, Morales P, Adams GP, Ratto MH. 2011.** *In vitro* fertilization and development of cumulus oocytes complexes collected by ultrasound-guided follicle aspiration in superstimulated llamas. *Theriogenology* 75: 1482-1485.
3. **Bertoldo M, Holvoake PK, Evans G, Grupen CG. 2010.** Oocyte developmental competence is reduced in sows during the seasonal infertility period. *Reprod Fert Develop* 22: 122-1229. doi: 10.1071/RD10093
4. **Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. 1982.** Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod* 27: 147-158
5. **Conde PA, Herrera C, Trasorras VL, Giuliano SM, Director A, Miragaya MH, Chaves MG, et al. 2007.** *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Anim Reprod Sci* 109: 298-308.
6. **Del Campo MR, Del Campo CH, Donoso MX, Berland M, Mapletoft RJ. 1994.** *In vitro* fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology* 41: 1219-1229.
7. **Gordon I. 1994.** Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, UK: CAB International. 626 p.
8. **Huanca W, Adams G. 2007.** Semen collection and artificial insemination in llamas and alpacas. In: *Current therapy in large animal theriogenology*. 2nd ed. New York: Saunders. p 869-873.
9. **Huanca W, Cárdenas O, Olazábal C, Ratto M, Adams G. 2001.** Efecto hormonal y empadre sobre el intervalo a la ovulación en llamas. *Rev Inv Vet Perú* (Supl 1): 462-463.
10. **Huanca W, Cordero A, Huanca T, Cárdenas O, Adams GP, Ratto MH. 2009.** Ovarian response and embryo production in llamas treated with equine chorionic gonadotropin alone or with a progestin-releasing vaginal sponge at the time of follicular wave emergence. *Theriogenology* 72: 803-808. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.05.019
11. **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: 1175-1185. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.01.016
12. **Khatir H, Anouassi A, Tibary A. 2007a.** Effect of follicular size on *in vitro* developmental competence of oocytes and viability of embryos after transfer in the dromedary (*Camelus dromedarius*). *Anim Reprod Sci* 99: 413-420.

13. **Khatir H, Anouassi A, Tibary A. 2007b.** Quality and developmental ability of dromedary (*Camelus dromedarius*) embryos obtained by IVM/IVF, *in vivo* matured/IVF or *in vivo* matured/fertilized oocytes. *Reprod Dom Anim* 42: 263-270.
14. **Kruip TAM, Van Reenen CG. 2001.** Biotechnology of reproduction and farm animals welfare. In: Sustainable animal production. [Internet]. Available in: <http://www.agriculture.de>
15. **Miragaya MH, Chaves MG, Agüero A. 2006.** Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Ruminant Res* 61: 299-310. doi: 10.1016/j.smallrumres.2005.07.017
16. **Ratto M, Berland M, Huanca W, Singh J, Adams GP. 2005.** *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes. *Theriogenology* 63: 2445-2457.
17. **Ratto MH, Singh J, Huanca W, Adams GP. 2003.** Ovarian follicular wave synchronization and pregnancy rate after fixed-time natural mating in llamas. *Theriogenology* 60: 1645-1656.
18. **Trasorras V, Giuliano S, Miragaya M. 2013.** *In vitro* production of embryos in South American camelids. *Anim. Reprod Sci* 136: 187-193. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.10.009
19. **van den Hurk R, Zhao J. 2005.** Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63: 1717-1751.
20. **Wani NA, Nowshari MA. 2005.** Kinetics of nuclear maturation and effect of holding ovaries at room temperature on *in vitro* maturation of camel (*Camelus dromedarius*) oocytes. *Theriogenology* 64: 75-85.