

Caracterización de la emergencia y repetibilidad de la onda folicular en alpacas (*Vicugna pacos*)

Characterization of the emergency and repetibility of the follicular wave in alpacas (*Vicugna pacos*)

Alvaro Vasquez-Ydrogo¹, Alfredo Pozo C.¹, Melisa Ticona A.¹, Gabriel Tapia M.¹, Juan Zevallos A.², Wilfredo Huanca L.^{1,3}

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar la emergencia folicular y determinar la repetibilidad de la onda folicular en alpacas. Para ello, 34 hembras alpacas fueron seleccionadas e inducidas a ovulación mediante la aplicación parenteral de acetato de buserelina (día 0). Dos días después del estímulo hormonal, se registró el desarrollo folicular individual a partir del conteo del número total de folículos antrales ≥ 3 mm en ambos ovarios. Para esto, se hizo un seguimiento ecográfico transrectal inter diario por 60 días. Se determinó que la emergencia de la onda folicular se produjo el día 4.5 ± 1.4 (rango 2-8). El número de folículos antrales (NFA) ≥ 3 mm durante tres emergencias foliculares consecutivas fue de 2.8 ± 1.3 (rango 1-8). A pesar de haber una gran similitud ($p > 0.05$) en el NFA ≥ 3 mm durante tres emergencias foliculares sucesivas existe una diferencia significativa en el número promedio de folículos emergentes entre alpacas ($p < 0.05$). La repetibilidad del NFA ≥ 3 mm en las tres ondas foliculares fue de 0.72. El intervalo entre ondas fue de 16.9 ± 3.9 días (rango 8-24) y se identificó como un carácter variable entre animales, el cual presentó una repetibilidad de 0.23. Se concluye que el número de folículos emergentes ≥ 3 mm representa una característica altamente repetible en alpacas, pero variable entre animales; siendo además el intervalo entre ondas un carácter variable y no repetible.

Palabras clave: emergencia folicular, repetibilidad, folículos antrales, alpaca

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

² Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional del Altiplano. Puno, Perú

³ E-mail: _whuancal@unmsm.edu.pe

Recibido: 21 de marzo de 2019

Aceptado para publicación: 25 de junio de 2020

Publicado: 29 de septiembre de 2020

ABSTRACT

The study aimed to characterize the follicular emergence and determine the repeatability of the follicular wave in alpacas. For this, 34 female alpacas were selected and induced to ovulation by parenteral application of buserelin acetate (day 0). Two days after the hormonal stimulation, individual follicular development was recorded by counting the total number of antral follicles ≥ 3 mm in both ovaries. For this, an inter-daily transrectal ultrasound follow-up was done for 60 days. It was determined that the emergence of the follicular wave occurred on day 4.5 ± 1.4 (range 2-8). The number of antral follicles (NAF) ≥ 3 mm during three consecutive follicular emergencies was 2.8 ± 1.3 (range 1-8). Despite having a great similarity ($p > 0.05$) in the NAF ≥ 3 mm during three successive follicular emergencies there is a significant difference in the average number of emerging follicles between alpacas ($p < 0.05$). The repeatability of the NFA ≥ 3 mm in the three follicular waves was 0.72. The interval between waves was 16.9 ± 3.9 days (range 8-24) and was identified as variable among animals, which showed a repeatability of 0.23. It is concluded that the number of emerging follicles ≥ 3 mm represents a highly repeatable characteristic in alpacas, but variable among animals; the interval between waves was also variable and a non-repeatable character.

Key words: follicular emergency, repeatability, antral follicles, alpaca

INTRODUCCIÓN

Las comunidades altoandinas asentadas por encima de los 3800 msnm tienen a la ganadería como la actividad más importante, y dentro de esta la crianza de los camélidos sudamericanos domésticos, no solo por su capacidad de adaptación a las difíciles condiciones medioambientales, sino por su empleo como una fuente alimenticia de proteína de origen animal y como un recurso para la producción de fibra de buena calidad (Fernández-Baca, 1991), en donde este recurso animal se suele distribuir generalmente en rebaños de 10 a 100 animales (Bravo y Huanca, 2012).

La mejora de la calidad genética de un rebaño justifica la aplicación de biotecnologías reproductivas como la superovulación y la transferencia de embriones, con el propósito de producir múltiples crías de hembras genéticamente superiores (Stewart, 2013). Sin embargo, a pesar de que el uso de protocolos

de superovulación y que la tecnología de transferencia de embriones ha sido reportada en camélidos sudamericanos, aún existen deficientes resultados en la aplicación de la técnica de transferencia de embriones en estas especies, lo que ha sido relacionado con una alta variabilidad en la respuesta a los tratamientos con gonadotropinas durante la superestimulación y una baja tasa de recuperación de embriones (Ratto *et al.*, 2013).

Se cree que esta variación es dependiente del número de folículos que emergen durante el inicio de cada onda folicular, como sucede en rumiantes (Ireland *et al.*, 2007), en donde la técnica de superovulación ha demostrado ser más efectiva en vacas con mayor número de folículos antrales al inicio de la superovulación (Singh *et al.*, 2004). Los pequeños folículos antrales son el objetivo directo de los diversos protocolos con gonadotropinas y es precisamente la gran variabilidad individual en su número, lo que constituye el factor más limitante en el éxito de las biotecnologías de producción de em-

briones por superovulación en rumiantes (Ireland *et al.*, 2007).

Múltiples estudios sobre el desarrollo de folículos ováricos en bovinos y dromedarios han demostrado la posibilidad de poder realizar una clasificación de los animales a partir del número de sus folículos emergentes, previo al inicio de los procedimientos de superovulación; esto gracias a que se ha descrito por ultrasonografía, que el número de folículos antrales durante la emergencia de las ondas foliculares representa una característica muy variable entre individuos distintos, pero altamente repetible dentro de un mismo animal (Burns *et al.*, 2005; Manjunatha *et al.*, 2012).

A partir de lo expuesto, el presente estudio tuvo por objetivo caracterizar y determinar el número de folículos emergentes en cada onda folicular en alpacas a fin de realizar una clasificación de los animales basada en el número de sus folículos emergentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo fue realizado durante enero y marzo del 2016 en el Centro de Investigación y Producción (CIP) Chuquibambilla, perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional del Altiplano. Se encuentra ubicado a 3950 msnm, en la región de Puno, Perú. Se emplearon 34 alpacas Suri hembras adultas, vacías, sin antecedentes de anormalidades reproductivas y con presencia de un folículo dominante ≥ 7 mm. Todas las alpacas en estudio fueron alimentadas con pastos naturales, recibieron las mismas condiciones de manejo y se mantuvieron aisladas de los machos.

Las alpacas fueron distribuidas en dos grupos de similar número. Se procedió a dividir a los animales en dos grupos para reducir el estrés por manejo y manipulación. A todas

las alpacas se les sincronizó la emergencia de una nueva onda folicular mediante la aplicación intramuscular de 1 ml (4.2 μ g) de acetato de buserelina (Conceptal, Intervet, Alemania) (Día 0). Los ovarios fueron escaneados mediante un ecógrafo transrectal (Aloka SSD-500, Japón) acoplado a un transductor lineal de 5 MHz. Todas las ecografías fueron realizadas cada dos días por un único operador por 60 días.

El estímulo hormonal (D_0 = día cero) se aplicó para inducir la ovulación en los animales. Dos días después de su sincronización, se empezó un seguimiento ecográfico transrectal por individuo para determinar la posible ovulación, la cual fue establecida como la desaparición de un folículo dominante previamente registrado.

En ambos grupos de estudio, Todos los folículos ≥ 3 mm fueron medidos diametralmente. El número, tamaño y posición de las estructuras ováricas observadas fueron graficadas en ovariogramas independientes. El día de la emergencia folicular fue considerado como el día en que el nuevo folículo dominante presentó, retrospectivamente, un diámetro ≥ 4 mm (Adams *et al.*, 1990).

El número de folículos antrales (NFA) se definió como la cantidad total de folículos ≥ 3 mm de diámetro visibles por ultrasonografía en ambos ovarios. Cada animal fue evaluado durante la emergencia de tres ondas foliculares consecutivas para determinar la repetibilidad del número de folículos antrales por alpaca. Así mismo, se evaluó el NFA ≥ 3 mm durante días aleatorios (días 12 y 24) del crecimiento folicular para compararlos con el número de folículos antrales durante los días esperados de la emergencia folicular, según la metodología propuesta por Gobikruthanth *et al.* (2017) en vacas. Los días fijos 12 y 24 fueron elegidos tomando como referencia el trabajo de Vaughan *et al.* (2004) en donde se reporta que el intervalo entre emergencias foliculares sucesivas (intervalo interonda) es de 12 días.

La normalidad del NFA y del intervalo interonda fueron analizados mediante la prueba de D'Agostino-Pearson. Se emplearon las pruebas de Mann-Whitney para identificar diferencias significativas en el NFA entre la emergencia folicular y un periodo aleatorio de crecimiento folicular. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para determinar diferencias significativas en el NFA ≥ 3 mm entre alpacas individuales, entre emergencias foliculares sucesivas y entre las categorías de clasificación por animal. La repetibilidad (rango 0-1; donde 1 es una repetibilidad perfecta) fue calculada para el NFA ≥ 3 mm y el intervalo interonda. Se empleó el programa estadístico SPSS v. 24 (IBM, USA), y se consideraron que las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

El diámetro promedio de los folículos preovulatorios ≥ 7 mm al inicio del estudio fue de 9.3 ± 1.79 mm (rango 7-14). La tasa de ovulación fue del 100% (34/34) luego de la aplicación de un análogo de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) para la sincronización de la onda folicular. El intervalo desde la administración del análogo de GnRH hasta el desarrollo de una emergencia folicular fue de 4.5 ± 1.4 días (rango 2-8). No se reportaron emergencias foliculares los días 9 y 10 pos-sincronización; sin embargo, se presentaron tres animales que tuvieron la emergencia de sus ondas foliculares hasta llegado el día 12 pos-sincronización.

En la Figura 1 se representa la distribución del número de folículos antrales (NFA) ≥ 3 mm. El número promedio de folículos ≥ 3 mm no evidenció diferencias significativas entre las tres emergencias foliculares sucesivas (Figura 2). Sin embargo, se determinó que el número promedio de folículos emergentes ≥ 3 mm difiere significativamente

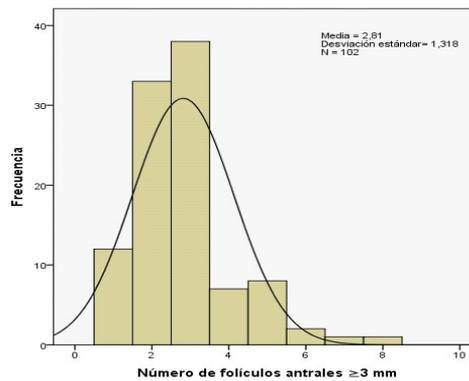


Figura 1. Distribución del número de folículos antrales ≥ 3 mm determinados durante la emergencia folicular en 34 alpacas

($p < 0.05$) entre alpacas, según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para muestras independientes.

El NFA ≥ 3 mm determinados durante tres emergencias foliculares consecutivas y dos periodos aleatorios de crecimiento folicular (días fijos 12 y 24) en las 34 alpacas se presenta en el Cuadro 1. La repetibilidad del NFA ≥ 3 mm determinada durante las tres emergencias foliculares consecutivas fue de 0.72 ($p < 0.01$) y durante dos periodos aleatorios de crecimiento folicular (días fijos 12 y 24) fue de 0.20 entre las mismas alpacas en estudio.

En el Cuadro 2 se presenta la clasificación de las 34 alpacas según el valor promedio del número de folículos antrales (NFA) ≥ 3 mm, donde las categorías propuestas fueron: alto (NFA > 3), intermedio ($3 \geq$ NFA > 2) y bajo (NFA ≤ 2).

El intervalo interonda promedio (\pm desviación estándar) fue del 16.9 ± 3.9 días, en donde los mayores porcentajes de intervalos fueron aquellos con 14 (16%), 16 (18%) y 18 (19%) días; inclusive registrándose intervalos de 20 a 24 días durante la evaluación de

Cuadro 1. Folículos ≥ 3 mm durante tres emergencias foliculares consecutivas y dos periodos aleatorios (días 12 y 24) de crecimiento folicular en 34 alpacas

	Folículos antrales ≥ 3 mm (n)	
	Emergencia	Aleatorio
Rango	1 - 8	1 - 6
Media \pm DE	2.8 ± 1.3	3.2 ± 1.6
Mediana \pm RIC	3 ± 1^a	3 ± 2^a

Letras distintas en una misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

DE: desviación estándar; RIC: rango intercuartil

68 ondas foliculares en 34 alpacas. Asimismo, se determinó que el intervalo interonda en alpacas presentó una repetibilidad de 0.23.

DISCUSIÓN

Este estudio pretendió caracterizar la emergencia folicular y determinar la repetibilidad de la onda folicular en alpacas en base

al conteo del número de folículos emergentes. Para ello, se procedió a la sincronización de la emergencia de una nueva onda folicular mediante la aplicación parenteral de un análogo de GnRH; la cual permitiría, según Miragaya *et al.* (2006), estimular el surgimiento de una nueva emergencia folicular sincronizada y el desarrollo de una fase lútea natural.

La tasa de ovulación luego de la estimulación hormonal fue de 100% (34/34); similar a la descrita por Andrade (2007) y Huanca (2008) en alpacas. La detección del cuerpo lúteo a los 5.8 ± 1.4 días y el diámetro máximo promedio de 12.6 ± 1.5 mm fueron similares a los reportados en alpacas por Fernández-Baca *et al.* (1970) y Bravo *et al.* (1991).

Luego de la ovulación, el desarrollo de un cuerpo lúteo no interrumpió el surgimiento de una nueva emergencia folicular, conforme a lo señalado por Ratto *et al.* (2003). Tampoco logró ejercer un efecto significativo sobre el número de folículos antrales ≥ 3 mm durante la primera emergencia folicular en comparación con las dos siguientes emergencias de las ondas foliculares; es decir, que a pesar del desarrollo luteal, el número de folículos emergentes ≥ 3 mm fue similar en las tres emergencias foliculares consecutivas.

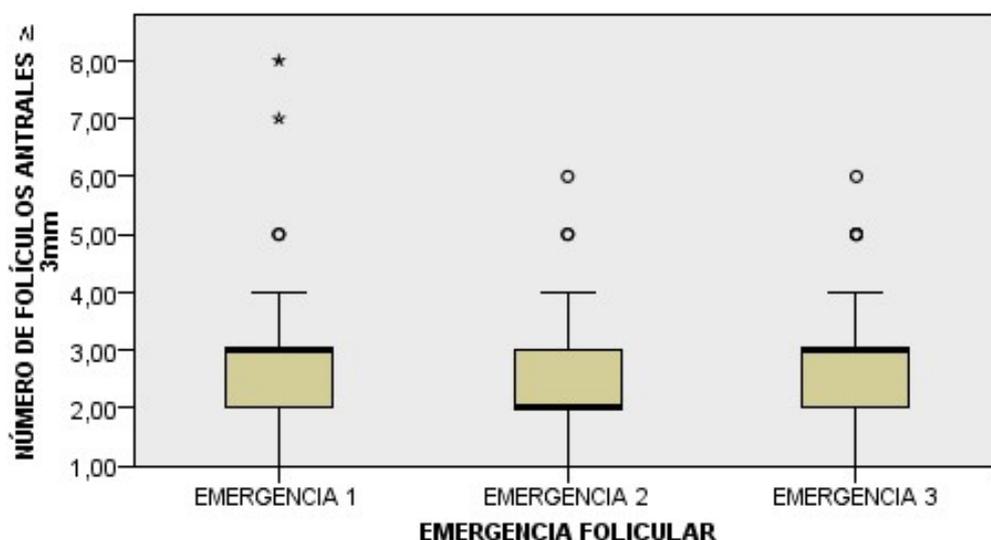


Figura 2. Diagrama de cajas del número promedio de folículos antrales ≥ 3 mm entre emergencias foliculares sucesivas en 34 alpacas

Cuadro 2. Clasificación de las alpacas según el número promedio de folículos antrales (NFA) ≥ 3 mm

Categorías	NFA (media \pm DE)	Alpacas (n)	Porcentaje (%)
Alto	4.3 \pm 1.6 ^a	8	24
Medio	2.7 \pm 0.6 ^b	16	47
Bajo	1.9 \pm 0.6 ^c	10	29
Total		34	100

^{a,b,c} Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

El intervalo entre la sincronización hasta la emergencia folicular fue de 4.5 ± 1.4 días, similar a intervalo de 4.3 ± 1.4 días reportado por Andrade (2007) en alpacas. El retraso en la emergencia folicular hasta el día 12 después de la sincronización de tres animales pudo deberse a la presencia de folículos preovulatorios en fase de regresión previos a la sincronización que estarían luteinizándose, fenómeno descrito en llamas por Bravo *et al.* (1990).

Para el desarrollo del análisis se asumió que el número de folículos emergentes ≥ 3 mm determinados por ultrasonografía transrectal reflejan la reserva de folículos primordiales disponible en una alpaca adulta, tomando de referencia el estudio histológico sobre la reserva ovárica realizado por Ireland *et al.* (2008) en vacas. En ese sentido, se pudo describir que el número de folículos antrales ≥ 3 mm durante la emergencia folicular en alpacas se caracteriza por presentar una distribución asimétrica en su histograma (Figura 1), donde la mayor parte de los animales presentaron un bajo número de folículos antrales (1 a 3 folículos). Según la prueba de D'Agostino-Pearson, se pudo verificar que el número de folículos emergentes ≥ 3 mm no sigue una distribución normal. Esta asimetría en la distribución de los folículos emergentes constituye un rasgo común en otras especies como los bovinos (Burns *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2007; Shahzad *et al.*, 2014; Gobi-

krushanth *et al.*, 2017) y dromedarios (Manjunatha *et al.*, 2012); y que, como tal, podría explicar en parte la respuesta individual diversa de estas especies a los distintos protocolos de superovulación ovárica descritos hasta la actualidad en alpacas.

Dado que el número de folículos antrales no presentó una distribución normal, la medida de tendencia central empleada debería ser la mediana en lugar de la media; sin embargo, por fines comparativos con relación a otros estudios, ambos valores fueron calculados y presentados en el presente trabajo.

El promedio (\pm desviación estándar) del número de folículos emergentes con un diámetro ≥ 3 mm fue de 2.8 ± 1.3 . Sin embargo, hubo animales que presentaron solo un folículo durante las tres emergencias foliculares y otros que presentaron de cinco a más folículos emergentes. El rango de 1-8 folículos ilustra la gran variación para esta característica en alpacas, hecho que fue descrito previamente por diversos autores en bovinos (Burns *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2007; Shahzad *et al.*, 2014; Gobikrushanth *et al.*, 2017) y dromedarios (Manjunatha *et al.*, 2012).

En base al registro individual de datos, se identificó una notable similitud en el número promedio de folículos ≥ 3 mm durante las emergencias de las ondas foliculares su-

cesivas ($p < 0.05$) (Figura 2); sin embargo, hubo una diferencia significativa en el número de folículos entre alpacas ($p < 0.05$). Así mismo, el NFA ≥ 3 mm durante tres emergencias foliculares consecutivas y durante dos periodos aleatorios de crecimiento folicular (días fijos 12 y 24) no difirieron significativamente (Cuadro 1). Esto podría ser explicado porque probablemente durante una etapa aleatoria de crecimiento folicular esté presente una población mixta de folículos en crecimiento y regresión (pequeños, medianos y grandes) lo cual contribuiría con un incremento en el NFA ≥ 3 mm y permitiría registrar de este modo un número de folículos similar al observado durante la emergencia de las ondas foliculares, en donde se espera que haya una población en crecimiento más funcionalmente homogénea (folículos pequeños y medianos). Esta similitud en el NFA promedio durante estadios distintos del desarrollo folicular ha sido descrita por Gobikrushanth *et al.* (2017) en vacas.

La repetibilidad de 0.72 de NFA ≥ 3 mm puede considerarse como alta (Harper, 1994). Esta repetibilidad es similar a la reportada en otras especies como los bovinos (Burns *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2007; Shahzad *et al.*, 2014; Gobikrushanth *et al.*, 2017) y dromedarios (Manjunatha *et al.*, 2012). Además, se pudo identificar que esta repetibilidad valorada durante tres emergencias foliculares consecutivas es mayor que aquella determinada durante dos periodos aleatorios del crecimiento folicular (días fijos 12 y 24) ($r = 0.20$); siendo esta menor repetibilidad comparable a la reportada en vacas Holstein ($r = 0.37$) (Gobikrushanth *et al.*, 2017). Estos resultados sugieren que la evaluación ecográfica del número de folículos antrales ≥ 3 mm durante la emergencia de una onda folicular podría representar un criterio de selección de alpacas, como un paso previo al inicio de los protocolos de superovulación.

Mossa *et al.* (2012) encontraron una alta repetibilidad (0.95) del número de folículos antrales en vacas Holstein, siendo similar a la reportada por Manjunatha *et al.* (2012) en

dromedarios ($r = 0.95$) y por Shahzad *et al.* (2014) en búfalos (0.85). En un estudio paralelo en vacas lecheras se identificó una moderada repetibilidad (0.58) en el conteo total de folículos emergentes luego de una ablación folicular (Boni *et al.*, 1997), posiblemente debido a la falta de un seguimiento ecográfico de la onda folicular, ya que la evaluación del número de folículos se limitó a un periodo fijo de 10 días luego de la ablación.

La repuesta a los protocolos de superovulación en alpacas son variables; así, Huanca (2008) obtuvo hasta 27 folículos preovulatorios, mientras que en el presente estudio fue de hasta 8 folículos. Esto podría indicar que en alpacas, el diámetro al cual los folículos emergentes se convertirían en dependientes de gonadotropinas (especialmente FSH) podría estar alrededor de los 2 mm, como sucede el ovino (McNeilly *et al.*, 1991). En función a lo descrito por Shazad *et al.* (2014) en búfalos, las alpacas fueron clasificadas con base al número de folículos emergentes en tres categorías, pudiéndose estimar que un 25% de las alpacas presentarían un número alto de folículos antrales.

El intervalo interonda de 16.9 ± 3.96 días; donde la mayoría de las ondas foliculares fue entre 14 y 18 días, fue similar al descrito por Vaughan *et al.* (2004) en donde se observaron un mayor número de intervalos interonda entre 12 y 16 días. Estas diferencias entre estudios podrían deberse, en parte, al mayor tamaño que exhiben los folículos dominantes en el presente estudio (9-13 mm); pues según Vaughan *et al.* (2004), el diámetro del folículo dominante se halla directamente correlacionado con el largo del intervalo interonda.

La repetibilidad de 0.23 del intervalo interonda puede indicar que esta característica no repetible dentro de un mismo animal (Harper, 1994). Por otro lado, este valor fue menor que el $r = 0.88$ reportado por Manjunatha *et al.* (2012) en dromedarios; observaciones que permitirían definir al intervalo interonda como una característica no previsible en alpacas.

CONCLUSIONES

- El número de folículos antrales ≥ 3 mm durante la emergencia folicular es distinto entre alpacas adultas ($p < 0.05$).
- El número de folículos antrales ≥ 3 mm durante la emergencia folicular es una característica repetible dentro de un mismo individuo ($r = 0.72$) ($p < 0.01$).
- El intervalo entre ondas foliculares representa una característica variable y no repetible ($r = 0.23$) en alpacas.

LITERATURA CITADA

1. **Adams GP, Sumar J, Ginther OJ. 1990.** Effects of laccational and reproductive status on ovarian follicular waves in llama (*Lama glama*). *J Reprod Fertil* 90: 535-545. doi: 10.1530/jrf.0.0900535
2. **Andrade JC. 2007.** Métodos de sincronización de la onda folicular en base a GnRH y LH y su efecto en la respuesta ovárica y tasa de preñez en alpacas y llamas. Tesis de Maestría. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 70 p.
3. **Boni R, Roelofsen MW, Pieterse M, Kogut J, Kruip TA. 1997.** Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology* 48: 277-289. doi: 10.1016/s0093-691x(97)84075-7
4. **Bravo PW, Fooler ME, Stabenfeldt GH, Lasley BL. 1990.** Ovarian follicular dynamics in the llama. *Biol Reprod* 43: 579-585. doi: 10.1095/biolreprod43.4.579
5. **Bravo PW, Stabenfeldt GH, Lasley BL, Fowler ME. 1991.** The effect of ovarian follicle size on pituitary and ovarian responses to copulation in domesticated South American camelids. *Biol Reprod* 45: 553-559. doi: 10.1095/biolreprod45.4.553
6. **Bravo PW, Huanca W. 2012.** Aspectos técnicos, culturales y científicos de la crianza de llamas y alpacas en sudamérica. En: VI Congreso Mundial de Camelidos Sudamericanos. Chile.
7. **Burns D, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Knight P, Ireland JJ. 2005.** Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol Reprod* 73: 54-62. doi: 10.1095/biolre-prod.104.-036277
8. **Fernandez-Baca S, Hansel W, Novoa C. 1970.** Corpus luteum function in the alpaca. *Biol Reprod* 3: 252-261. doi: 10.1093/biolreprod/3.2.252
9. **Fernandez-Baca S. 1991.** Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Santiago de Chile: Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. 429 p.
10. **Gobikrushanth M, Dutra P, Bruinje T, Colazo M, Butler S, Ambrose D. 2017.** Repeatability of antral follicle counts and anti-Müllerian hormone and their associations determined at an unknown stage of follicular growth and an expected day of follicular wave emergence in dairy cows. *Theriogenology* 92: 90-94. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.01.018
11. **Harper DGC. 1994.** Some comments on the repeatability of measurements. *Ring Migrat* 15: 84-90. doi: 10.1080/03078698.1994.9674078
12. **Huanca T. 2008.** Efecto de la administración de gonadotropinas exógenas (FSH y eCG) en la respuesta ovárica y producción de embriones en alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis Doctoral. España: Univ de Santiago de Compostela. 142 p.
13. **Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Smith G, Lonergan P, Evans A. 2007.** Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod* 22: 1687-1695. doi: 10.1093/humrep/dem071

14. **Ireland JL, Scheetz D, Jimenez-Krasse F, Themmen A, Ward F, Lonergan P, Smith G, et al. 2008.** Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod* 79: 1219-1225. doi: 10.1095/biolreprod.108.071670
15. **Manjunatha B, Pratap N, Al-Bulushi S, Hago BE. 2012.** Characterization of ovarian follicular dynamics in dromedary camels (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology* 78: 965-973. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.05.011
16. **McNeilly AS, Crow W, Campbell BK. 1991.** Effect of follicular fluid and inhibin immunoneutralization on FSH-induced preovulatory follicle growth in the ewe. *J Endocrinol* 131: 401-409. doi: 10.1677/joe.0.1310401
17. **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
18. **Mossa F, Walsh S, Butler S, Berry D, Carter F, Lonergan P, Smith G, et al. 2012.** Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J Dairy Sci* 95: 2355-2361. doi: 10.3168/jds.2011-4325
19. **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. doi: 10.1016/s0093-691x(03)00176-6
20. **Ratto MH, Silva M, Huanca W, Huanca T, Adams GP. 2013.** Induction of superovulation in South American camelids. *Anim Reprod Sci* 136: 164-169. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.10.006
21. **Shahzad Q, Riaz R, Akhter T, Sattara A, Nazirb J, Niazi A, Azam A, Husnac A. 2014.** Repeatability of antral follicular count and its correlation with super stimulation in Nili-Ravi Buffaloes. *J Anim Plant Sci* 24: 765-769.
22. **Singh J, Dominguez M, Jaiswal R, Adams GP. 2004.** A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology* 62: 227-243. doi: 10.1016/j.theriogenology.-2003.09.020
23. **Stewart B. 2013.** Embryo production by superovulation and dual siring in alpacas. MSc Thesis. USA: Ohio State University. 51 p.
24. **Vaughan JL, Macmillan KL, D'Occhio MJ. 2004.** Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Anim Repro Sci* 80: 353-361. doi: 10.1016/j.anireprosci.2003.08.002