

Evaluación de un nuevo protocolo de superovulación en llamas: respuesta ovárica, recuperación embrionaria y alteraciones pos-tratamiento

Evaluation of a new protocol of superovulation in llamas: ovarian response, embryo recovery and post treatment effects

Joel I. Pacheco C.^{1,2}, Víctor M. Vélez M.¹, Wilber C.R. García V.¹

RESUMEN

El trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de dos dosis de eCG sobre la respuesta superovulatoria, tasa de recuperación embrionaria y alteraciones reproductivas inducidas. Se utilizaron 32 llamas adultas, clínicamente sanas, distribuidas en dos grupos: Grupo I (700 UI eCG; n=15) y Grupo II (500 UI eCG; n=21). El protocolo de superovulación incluyó: día 1, inducción de ovulación (GnRH); día 4, aplicación eCG, según dosis establecida para cada grupo; día 8, aplicación de luteolítico (PGF_{2α}); día 11, ecografía para verificar el número de folículos y aplicación de análogo de GnRH; días 11 y 12, monta natural para inducir ovulación; día 19, lavado uterino y recuperación de embriones (se consideró como torsión cervical cuando se dificultó el paso de la sonda Foley hacia el útero); día 26: evaluación ecográfica para determinar la presencia de alteraciones reproductivas. El número de folículos por hembra para los grupos I y II fue de 4.9 y 3.7, respectivamente. El número de embriones colectados fue de 1.6 y 2.6 por hembra en los grupos I y II, respectivamente, lo cual indicaría la existencia de posibles fallas ovulatorias o luteinizaciones tempranas en el grupo I. La frecuencia de quistes foliculares y cuerpos lúteos persistentes fue superior en el grupo I respecto al grupo II, mientras que la frecuencia de metritis y torsiones cervicales fueron similares en ambos grupos. Se concluye que la dosis de 500 UI de eCG permite obtener una menor cantidad de folículos, pero un mayor número de embriones y menor frecuencia de problemas reproductivos en el pos-tratamiento.

Palabras clave: superovulación, eCG, embriones, llama

¹ Grupo de Investigación de Producción y Sanidad en Ganadería Altoandina, Estación IVITA Marangani, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Cusco, Perú

² E-mail: jpachecoc@unmsm.edu.pe

Estudio financiado por el Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Proyecto A18081611-2018

Recibido: 18 de diciembre de 2019

Aceptado para publicación: 15 de julio de 2020

Publicado: 29 de septiembre de 2020

ABSTRACT

The work aimed to evaluate the effect of two doses of eCG on the superovulatory response, embryonic recovery rate and reproductive disorders. Thirty-two clinically healthy adult llamas were used, divided into two groups: Group I (700 IU eCG; n = 15) and Group II (500 IU eCG; n = 21). The superovulation protocol included: day 1, induction of ovulation (GnRH); day 4, application of eCG according to the dose established for each group; day 8, application of luteolytic (PGF_{2α}); day 11, ultrasound to verify the number of follicles and application of GnRH analog; days 11 and 12, natural mating to induce ovulation; day 19, uterine lavage and embryo recovery (it was considered as cervical torsion when the Foley catheter was difficult to pass to the uterus); day 26: ultrasound evaluation to determine the presence of reproductive disorders. The number of follicles per female for groups I and II was 4.9 and 3.7, respectively. The number of embryos collected was 1.6 and 2.6 per female in groups I and II, respectively, which would indicate the existence of possible ovulatory failure or early luteinization in group I. The frequency of persistent follicular cysts and corpus luteum was higher in Group I compared to Group II, while the frequency of metritis and cervical torsion were similar in both groups. It is concluded that the 500 IU dose of eCG allows obtaining a smaller number of follicles, but a greater number of embryos and a lower frequency of reproductive problems in the post-treatment.

Key words: superovulation, eCG, embryos, llama

INTRODUCCIÓN

La técnica de transferencia embrionaria en camélidos sudamericanos tiene diversas limitaciones para su aplicación en forma masiva debido a la variabilidad de la respuesta a los diferentes protocolos de superovulación (Ratto *et al.*, 2015). En dichos protocolos de superovulación se utilizaron hormonas como FSH (hormona folículo estimulante), eCG (gonadotropina coriónica equina) y sus combinaciones, así como diferentes tipos de manejo previo de la onda folicular, habiéndose utilizado hembras en fase lútea natural pos-inducción de ovulación, fase lútea artificial con el uso de dispositivos de liberación de progestágenos y uso de hembras al inicio de la onda folicular determinado mediante ecografía (Bourke *et al.*, 1994; Gamarra *et al.*, 2006).

Las dosis de eCG descritas en investigaciones previas varían desde 1000 UI en dosis única (Bourke *et al.*, 1994; Huanca, 2005), 500 UI diariamente por 3 días, haciendo un total de 1500 UI (Correa *et al.*, 1997), hasta 1200 UI en dosis única (Ratto *et al.*, 2007), lográndose en todos los casos respuestas superovulatorias variables. Asimismo, Huanca *et al.* (2006) indican que un protocolo superovulatorio utilizando eCG no afecta la tasa de aceptación a la cópula un mes después del tratamiento; sin embargo, no indican la dosis de eCG utilizada.

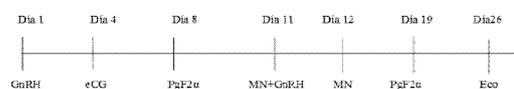
La ovulación ocurre entre las 26 y 30 horas pos-aplicación de GnRH (Rodríguez *et al.*, 2012), considerando que es necesario iniciar un protocolo de superovulación en ausencia de un folículo dominante (Trasorras *et al.*, 2012). La emergencia de la nueva onda folicular pos-inducción de ovulación en lla-

mas ocurre el día 4.6 en promedio (Andrade, 2007). La eCG ha sido usada como hormona superovulatoria en camélidos sudamericanos, siendo efectiva mediante la aplicación de una sola inyección (Trasorras *et al.*, 2012). El cuerpo lúteo formado luego de una ovulación no presenta capacidad de respuesta ante la aplicación de prostaglandina $F_{2\alpha}$ en los primeros 4 días de la inducción de la ovulación, el día 5 presenta una leve sensibilidad y recién entre los días 6-8 se puede inducir luteólisis mediante la administración de $PGF_{2\alpha}$ o su análogo, el cloprostenol, en llamas (Bianchi *et al.*, 2012). Luego de aplicar un protocolo de superovulación, se ha utilizado la hCG para inducir ovulaciones sincrónicas de los múltiples folículos formados (Bourke, 1995); aunque también se ha utilizado una dosis de GnRH para mejorar la tasa ovulatoria (Ratto *et al.*, 2013; Sumar, 2013), además de realizar una o dos montas sucesivas.

En marranas, el uso de altas dosis de eCG produce la aparición de quistes foliculares de manera dosis-dependiente cuando es combinada con hCG (Manjarin *et al.*, 2015). La respuesta superovulatoria en camélidos sudamericanos es muy variable entre individuos además de causar alteraciones luego del tratamiento (Von Baer *et al.*, 2003), tales como quistes foliculares (Bravo *et al.*, 1995). Sin embargo, cuerpos lúteos persistentes, metritis y ovarios acíclicos no han sido reportados en trabajos de superovulación, aunque es un problema latente que origina la desconfianza del productor de utilizar sus mejores animales en protocolos de superovulación. Ante esta situación, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo describir la tasa de superovulación, tasa de recuperación embrionaria y presencia de alteraciones reproductivas pos-superovulación en llamas tratadas con 700 y 500 UI de eCG bajo un nuevo protocolo de superovulación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de investigación se realizó entre octubre de 2018 y marzo de 2019 en el Centro de Investigación La Raya del Centro de Investigación IVITA, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ubicado en la Región Cusco, Perú, a una altitud de 4400 m. Se utilizaron 36 llamas hembras vacías, adultas con un adecuado historial reproductivo y cría en pie. Los animales presentaban condición corporal promedio de 3 (escala de 1-5), peso promedio de 85 kg y fueron mantenidos sobre pasturas naturales.



El nuevo protocolo se inició con la selección de las hembras mediante ecografía (Tringa linear, Esaote®, Países Bajos), seleccionándose animales con presencia de un folículo preovulatorio con diámetro ≥ 7 mm. Los animales fueron distribuidos en dos grupos experimentales: Grupo I (700 UI eCG), n=15, y Grupo II (500 UI de eCG), n=21. El protocolo de superovulación fue el siguiente:

- Día 1: Se aplicó 8.4 μ g de acetato de busarelina (análogo de GnRH, Conceptase®), para inducir ovulación, la cual fue confirmada mediante ecografía.
- Día 4: Se aplicó eCG (Novormon®), según la dosis establecida para cada grupo, para producir la superovulación cuando está iniciando la nueva onda folicular (Andrade, 2007).
- Día 8: Se aplicó 0.26 mg de cloprostenol sódico (análogo de $PGF_{2\alpha}$; Lutaprost®), para causar luteólisis del cuerpo lúteo formado después de la primera inducción de ovulación (Día 1) (Bianchi *et al.*, 2012)
- Días 11 y 12: Se realizó la monta natural (MN) utilizando el mismo macho en cada hembra.

- Día 11: Se hizo una segunda ecografía para verificar el número y diámetro de los folículos producto de la superovulación. Además, se aplicó 84 µg del análogo de GnRH para mejorar la tasa de ovulación (Ratto *et al.*, 2013).
- Día 19: Se hizo el lavado uterino y recuperación de embriones. Se aplicó 0.26 mg de análogo de PGF_{2α} para causar luteólisis de los cuerpos lúteos formados y evitar problemas reproductivos posteriores (como persistencia de cuerpo lúteo o metritis relacionada a un estado de pseudo-gestación).
- Día 26: Se realizó la evaluación ovárica y uterina mediante ecografía para determinar la presencia de cuerpos lúteos persistentes (cuerpos lúteos o folículos luteinizados), quistes foliculares y metritis, así como iniciar un tratamiento individualizado de ser necesario.

Los datos fueron analizados y presentados utilizando estadística descriptiva (media aritmética y proporciones porcentuales).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diez y cinco hembras sometidas al protocolo de superovulación en los grupos I y II no produjeron embriones (Cuadro 1). Es así que se obtuvieron embriones en 5/15 (33.3%) y 16/21 (76.1%) de las hembras, lo cual se traduce en 1.6% (5/8) y 2.6% (42/16) de embriones por hembra que produjo embriones al lavado. Estos resultados son inferiores al reportado por Ratto *et al.* (2013) y podría corresponder a la variación propia de los individuos. Este hallazgo es consistente con lo descrito por Huanca (2008), quien indica que solo el 53% de las alpacas superovuladas produjeron embriones. Las respuestas obtenidas en este estudio indican una mayor tasa de colección de embriones al utilizar 500 UI de eCG respecto a 700 UI, especialmente considerando que se conoce que a altas dosis de PMSG se disminuye el número de embriones viables colectados (Gonzalez *et al.*, 1994).

El número de embriones colectados por tratamiento fue claramente diferente entre grupos, indicando un efecto dosis-dependiente, tal como ha sido descrito (Bravo *et al.*, 1995; Huanca *et al.*, 2009; Ratto *et al.*, 2013). Huanca *et al.* (2012) indicaron, asimismo, que obtuvieron 3.5 embriones por llama superovulada al utilizar 800 UI de eCG, resultado superior al presente estudio, y concordante a la mayor cantidad de hormona utilizada.

En las llamas tratadas con 500 UI de eCG se obtuvieron 3.7 folículos en promedio (Cuadro 2), inferior al reporte de Bravo *et al.* (1995), quienes indican 4.7 folículos en alpacas tratadas con 500 UI de eCG; sin embargo, Trasorras *et al.* (2009) mencionan que solo tuvieron una respuesta superovulatoria de 17% cuando utilizaron 500 UI de eCG, siendo la dosis óptima de 1000 UI. Esta respuesta altamente variable podría deberse a que en dicho estudio se utilizaron animales con mayor peso (120 kg) mientras que en el presente estudio fueron más livianos (85 kg en promedio). Esto indica que se requiere validar el efecto de la dosis de acuerdo al peso vivo. Además, hay que considerar que el estudio de Trasorras *et al.* (2009) se hizo con animales en estabulación y a nivel del mar.

La respuesta superovulatoria fue muy variable, encontrándose hembras con 1 a 9 folículos pos-tratamiento, lo cual está ampliamente descrito en camélidos (Ratto *et al.*, 2013). Este resultado podría estar influenciado, además, por la alta variabilidad de la concentración de la hormona eCG en los preparados comerciales (Herrera *et al.*, 2016).

Se pudo observar un efecto dosis-dependiente en el número de folículos por hembra, encontrándose 4.9 folículos cuando se utilizó 700 UI de eCG y 3.7 folículos cuando se utilizó 500 UI, respuesta consistente con lo descrito por Ratto *et al.* (2007), quienes describen mayor cantidad de folículos cuando utilizaron una alta dosis de eCG (1200 UI). La cantidad de folículos producidos por

Cuadro 1. Número de embriones colectados por llama superovulada según la dosis de eCG

Tratamiento	Embriones por hembra						Embriones/hembra superovuladas		Total de embriones (n)
	0	1	2	3	4	9	n	%	
GI: 700 UI eCG (n=15)	10	3	1	1	-	-	8/5	1.6	8
GII: 500 UI eCG (n=21)	5	5	5	2	3	1	42/16	2.6	42

Cuadro 2. Tasa de superovulación, de recuperación embrionaria y presencia de problemas reproductivos en llamas superovuladas, según la dosis de eCG

Dosis	Folículos (≥ 7 mm)			Respuesta por animal n (%)		Problemas reproductivos			
	O. izq. n (%)	O. der. n (%)	Total	Fol n (%)	Emb n (%)	QF n (%)	CLP n (%)	M n (%)	TC n (%)
700 UI (n=15)	41 (55.4)	33 (44.6)	74	74/15 (4.9)	8/5 (1.6)	6 (40.0)	8 (53.5)	1 (6.7)	3 (20.0)
500 UI (n=21)	44 (55.7)	35 (44.3)	79	79/21 (3.7)	42/16 (2.6)	1 (4.7)	4 (19.04)	1 (4.7)	3 (14.3)

O. izq: Ovario izquierdo; O. der: Ovario derecho; Fol: Folículo; Emb: Embrión; QF: quiste folicular; CLP: cuerpo lúteo persistente; M: metritis; TC: torsión cervical

superovulación es inferior al reporte de Huanca *et al.* (2009), quienes indican la presencia de 16.6 folículos utilizando 1000 UI de eCG, confirmando el efecto dosis-dependiente de esta hormona.

La mayor proporción de respuesta superovulatoria del ovario izquierdo (OI) respecto al ovario derecho (OD) se presentó en los dos grupos experimentales (Cuadro 2);

respuesta similar a lo descrita por Fernández-Baca *et al.* (1970), quienes indican 59.1 y 40.9 % de cuerpos lúteos en 44 alpacas con gestaciones tempranas luego de ovulaciones naturales en el OI y OD, respectivamente; sin embargo, un reporte posterior de estos autores con mayor número de animales no llegaron a encontrar diferencia estadística de ovulaciones naturales entre los dos ovarios (Fernández-Baca *et al.*, 1973).

El promedio de embriones colectados por hembra fue de 1.6 y 2.6 para los grupos I y II, respectivamente (Cuadros 1 y 2), pese a que en el grupo I se presentó un mayor número de folículos producto de la superovulación. Esto podría indicar fallas en la ovulación y una posible luteinización de los folículos, tal como lo indican Vaughan *et al.* (2013). Otra posible causa de la menor cantidad de embriones colectados respecto a la cantidad de folículos existentes es el mayor tamaño que alcanzan los ovarios superestimulados, toda vez que se desplazan fuera de la bolsa ovárica al presentar un mayor diámetro, causando pérdida de ovocitos hacia la cavidad abdominal (Trasorras *et al.*, 2012, 2017). De otro lado, todos los embriones colectados fueron blastocistos eclosionados, no habiéndose obtenido estructuras embrionarias con zona pelúcida (Huanca *et al.*, 2013; Picha *et al.*, 2013).

Los problemas reproductivos posteriores al tratamiento con eCG son frecuentes en camélidos sudamericanos. Bravo *et al.* (1995) reportaron presencia de quistes foliculares luego de un protocolo de superovulación utilizando eCG, incrementando su número a medida que se aumenta la dosis de eCG, similar a lo observado en el presente estudio, donde se registró mayor frecuencia de quistes foliculares al utilizar 700 UI de eCG respecto a una dosis menor, evidenciando una respuesta dosis-dependiente, tal como ha sido reportado también en cerdas (Manjarin *et al.*, 2015). La frecuencia de metritis fue mínima en ambos grupos, y pareciera no estar relacionada a la actividad de la hormona superovulatoria; sin embargo, en ambos grupos se registraron casos de torsiones cervicales, posiblemente causada por la evidente alteración en los patrones hormonales de estradiol y progesterona, tal como fue descrito en vacas sometidas a protocolos de superovulación utilizando PMSG (Bevers y Dieleman, 1987) además de encontrarse en fase lútea.

CONCLUSIONES

El uso de un protocolo superovulatorio con una dosis de 500 UI de eCG logra una menor respuesta superovulatoria respecto a la dosis de 700 UI de eCG; sin embargo, la tasa de recuperación de embriones es superior y la frecuencia de problemas reproductivos posteriores (quistes foliculares) fue menor.

LITERATURA CITADA

1. **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 de alpacas y llamas. Tesis de Magister. Lima, Perú: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 79 p.
2. **Bevers MM, Dieleman SJ. 1987.** Superovulation in cows with PMSG: variations in plasma concentrations of progesterone, oestradiol, LH, cortisol, prolactin, and PMSG and in number of preovulatory follicles. *Anim Reprod Sci* 15: 37-52. doi: 10.1016/0378-4320(87)-90004-2
3. **Bianchi CP, Cavila MV, Jorgensen E, Benavente MA, Aba M. 2012.** Development of corpus luteum susceptibility to an analog of prostaglandin $F_{2\alpha}$ throughout the luteal phase in llamas (*Lama glama*). *Anim Reprod Sci* 131: 199-203.
4. **Bourke DA, Adam CL, Kyle CE, McEvoy TG. 1994.** Ovarian response to PMSG and FSH in llamas. In: First European Symposium on South American camelids. Bonn, Germany.
5. **Bourke DA, Kyle CE, McEvoy TG, Young P, Adam, C.L. 1995.** Superovulatory response to eCG in llamas (*Lama glama*). *Theriogenology* 44: 255-268. Doi: 10.1016/0093-691x(95)00175-8
6. **Bravo PW, Tsutsui T, Lasley BL. 1995.** Dose response to equine chorionic gonadotropin and subsequent ovulation

- in llamas. *Small Ruminant Res* 18: 157-163. doi: 10.1016/0921-4488(95)00721-V
7. **Correa JE, Ratto MH, Gatica R. 1997.** Superovulation in llamas (*Lama glama*) with pFSH and equine chorionic gonadotrophin used individually or in combination. *Anim Reprod Sci* 46: 289-296. doi: 10.1016/s0378-4320(96)01615-6
 8. **Fernandez-Baca S, Hansel W, Novoa C. 1970.** Embryonic mortality in the alpaca. *Biol Reprod* 3: 243-251. doi: 10.1093/biolreprod/3.2.243
 9. **Fernández-Baca S Sumar J, Novoa C, Leyva V. 1973.** Relación entre la ubicación del cuerpo lúteo y la localización del embrión en la alpaca. *Rev Inv Vet Perú* 2: 131-135.
 10. **Gamarra G, Gallegos A, Asparrin H, Vivanco-Mackie W. 2006.** Development of superovulatory strategies in alpacas. *Reprod Fert Develop* 19: 238-238. doi: 10.1071/RDv19n1Ab244
 11. **Gonzalez A, Wang H, Carruthers TD, Murphy BD, Mapletoft RJ. 1994.** Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effects of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. *Can Vet J* 35: 158-162.
 12. **Herrera R, Nogueira F, Pinto M, Elane de Almeida B, De Oliveira J, Bartolini P. 2016.** Physical-chemical and biological characterization of different preparations of equine chorionic gonadotropin. *J Vet Sci* 17: 459-465. doi: 10.4142/jvs.2016.17.4.459
 13. **Huanca T. 2008.** Efecto de la administración de las gonadotropinas exógenas (FSH y eCG) en la respuesta ovárica y en la producción de embriones en alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis Doctoral. Lugo, España: Univ. de Santiago de Compostela. 78 p.
 14. **Huanca T, Sumar J, Naveros M, Cardenas O, Gonzales M, Mamani R. 2012.** Twin reciprocal embryo transfer between alpacas and llamas. In: ICAR Satellite Meeting on Camelid Reproduction. Vancouver, Canada.
 15. **Huanca W. 2005.** Aplicación de biotecnologías reproductivas en especies domésticas y silvestres de camélidos sudamericanos. *Agrociencia* 9: 505-509.
 16. **Huanca W, Gonzales ML, Cordero A, Huanca T. 2006.** Comportamiento reproductivo de donadoras de embriones, después de un protocolo de superovulación en llamas. En: IV Congreso Mundial sobre Camélidos. Catamarca, Argentina.
 17. **Huanca W, Cordero A, Huanca T, Cardenas O, Adams GP, Ratto MH. 2009.** Ovarian response and embryo production in llamas treated with equine chorionic gonadotropin alone or with progesterin-releasing vaginal sponge at the time of follicular wave emergence. *Theriogenology* 72: 803-808. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.05.019
 18. **Huanca W. 2013.** Factores que afectan la eficiencia de la transferencia de embriones en camélidos domésticos. En: XXXVI Reunión Científica Anual de Producción Animal – APPA. Lima, Perú.
 19. **Manjarín R, Cassar G, Friendship RM, Garcia JC, Dominguez JC, Kirkwood RN. 2015.** Effect of additional human chorionic gonadotrophin (hCG) on follicular growth and ovulation in gonadotrophin-treated gilts. *Can J Vet Res* 79: 210-213.
 20. **Picha Y, Tibary A, Memon M, Kasimanickam R, Sumar J. 2013.** Chronology of early embryonic development and embryo uterine migration in alpacas. *Theriogenology* 79: 702-708. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.11.027
 21. **Ratto M, Gomez C, Berland M, Adams G. 2007.** Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Anim Reprod Sci* 97: 246-256. doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.02.002

22. **Ratto MH, Silva ME, 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
23. **Ratto MH, Silva ME, Huanca T, Cordero A, Huanca W. 2015.** Inducción de superovulación en camélidos. *Spermova* 5: 253-257.
24. **Rodríguez C, Arellano P, Londoño P, Montenegro V, Picha Y, Sánchez D, Torres R, Sumar J. 2012.** Time interval between natural mating, vasectomized mating and GnRH ovulation in alpacas. In: ICAR Satellite Meeting on Camelid Reproduction. Vancouver, Canada.
25. **Sumar J. 2013.** Embryo transfer in domestic South American camelids. *Anim Reprod Sci* 136: 170-177. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.10.029
26. **Trasorras VL, Chaves MG, Miragaya MH, Pinto M, Rutter B, Flores M, Agüero A. 2009.** Effect of eCG superstimulation and busserelin on cumulus-oocyte complexes recovery and maturation in llamas (*Lama glama*). *Reprod Domest Anim* 44: 359-364. doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00972.x
27. **Trasorras VL, Chaves MG, Carretero MI, Miragaya MH. 2012.** Ovarian superovulation in south American camelids. In: ICAR Satellite Meeting on Camelid Reproduction. Vancouver, Canada.
28. **Trasorras VL, Carretero MI, Neild DM, Chaves MG, Giuliano SM, Miragaya MH. 2017.** Production, preservation, and transfer of South American camelid embryos. *Front Vet Sci* 4:190. doi: 10.3389/fvets.2017.00190
29. **Vaughan J, Mihm M, Wittek T. 2013.** Factors influencing embryo transfer success in alpacas - a retrospective study. *Anim Reprod Sci* 136: 194-204. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.10.010.
30. **von Baer A, Von Baer L, Donoso M, Poblete P, Miranda H, Del Campo M. 2003.** Efecto de diferentes parámetros en llamas (*Lama glama*) y alpacas (*Lama pacos*) en un programa de transferencia de embriones. En: III Congreso Mundial sobre Camélidos. Potosí, Bolivia.