

Transferencia embrionaria de llamas superovuladas y de ovulación simple en dos épocas del año y bajo condiciones de campo

Embryo transfer of super ovulated and single ovulated llamas at two periods of the year and under field conditions

Joel Iván Pacheco^{1,2}, Víctor Manuel Vélez¹, José Manuel Angulo-Tisoc¹, Wilber García¹

RESUMEN

Se evaluaron dos protocolos de producción de embriones: la super ovulación y la ovulación simple, determinándose la tasa de colección y calidad de los embriones, así como la fertilidad y natalidad durante la época reproductiva y no reproductiva, a 4200 msnm y bajo condiciones de campo. La tasa de colección de embriones en ovulación simple fue de 53% (44/83) embriones frente a 242.3% (63/26) en super ovulación. La calidad de los embriones colectados por ovulación simple fue: grado I (90.3 y 83.6 %) y grado II (9.4 y 16.7 %) y ninguno de grado III; mientras que en super ovulación fue: grado I (76.6 y 87.5 %), grado II (14.9 y 12.5 %) y grado III en 8.5 y 0% para las época reproductiva y no reproductiva, respectivamente. La fertilidad fue similar entre la ovulación simple (56.4%) y en super ovulación (56.0%). La natalidad fue de 41.0 y 30.0% para ovulación simple y super ovulación, respectivamente. Se concluye que ambas técnicas representan una alternativa factible para su aplicación en los sistemas de crianza altoandina de llamas.

Palabras clave: llama, embrión, transferencia de embriones, ovulación

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

² E-mail: jpachecoc@unmsm.edu.pe

Proyecto financiado por el Vicerrectorado de Investigación y Postgrado (VRIP)-UNMSM (A18081611 RR: 03202-R-18)

Recibido: 14 de junio de 2020

Aceptado por publicación: 15 de diciembre de 2020

Publicado: 23 de febrero de 2021

ABSTRACT

Two embryo production protocols were evaluated: superovulation and single ovulation, determining the collection rate and quality of the embryos, as well as fertility and natality during the reproductive and non-reproductive season, at 4200 meters above sea level and under field conditions. The collection rate of embryos in single ovulation was 53% (44/83) embryos versus 242.3% (63/26) in superovulation. The quality of the embryos collected by single ovulation was: grade I (90.3 and 83.6%) and grade II (9.4 and 16.7%) and none of grade III; while in superovulation it was: grade I (76.6 and 87.5%), grade II (14.9 and 12.5%) and grade III (8.5 and 0%) for the reproductive and non-reproductive seasons, respectively. Fertility was similar between single ovulation (56.4%) and superovulation (56.0%). The birth rate was 41.1 and 30.0% for single ovulation and superovulation, respectively. It is concluded that both techniques represent a feasible alternative for their application in the high Andean llama rearing systems.

Key words: llama, embryo, embryo transfer, ovulation

INTRODUCCIÓN

La transferencia embrionaria es una biotecnología alternativa para el mejoramiento genético utilizando individuos superiores, que viene siendo estudiada para su adecuación a las características fisiológicas reproductivas particulares de los camélidos sudamericanos (Huanca, 2005). La recuperación de embriones se realiza mediante la técnica no quirúrgica el día 7 pos-cópula, realizando lavado uterino vía transcervical con ayuda manual desde el recto, y utilizando catéteres de doble vía y medio de lavado enriquecido, bajo anestesia epidural y eventualmente aplicando tranquilizantes al animal (Trasorras, 2012; Sumar, 2013). La transferencia se realiza depositando el embrión directamente en el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo (Carnero *et al.* 2011).

La respuesta super ovulatoria en camélidos sudamericanos se caracteriza por ser extremadamente variable e impredecible, dado que existen factores como especie, raza, edad, lactancia, condición corporal, preparados hormonales y protocolos, entre otros, que

tendrían efecto directo en esta respuesta (Ratto *et al.*, 2013; Sumar, 2013). De forma similar a otras especies, la técnica de multiovlación y transferencia de embriones fue adaptada para su aplicación en alpacas (Bourke *et al.*, 1995); sin embargo, en promedio, solo el 33.5% de las hembras responden satisfactoriamente a la super ovulación, y muchas de ellas producen ovocitos con desarrollo anormal, deficiente maduración nuclear y citoplásmica, lo que afecta las tasas de fertilización (Vaughan *et al.* 2013).

La hormona eCG produce alta respuesta super ovulatoria, alrededor del 82% en llamas durante la fase lútea artificial (Bourke *et al.*, 1994), pudiendo obtenerse super ovulaciones con dosis repetidas de eCG (Correa *et al.*, 1997). En los casos que se utiliza la fase lútea natural se obtienen mejores resultados, con dosis que varían de 500 hasta 1000 UI; sin embargo, dosis mayores están relacionadas a bajas tasas de recuperación de embriones por un desplazamiento de la bolsa ovárica debido al gran tamaño del ovario super estimulado (Trasorras *et al.*, 2012). El tratamiento de alpacas con 400 UI de eCG resulta en la producción de cuatro embriones

por alpaca donadora (Huanca *et al.* 2012), en tanto que dosis entre 500 a 750 UI de eCG en una sola aplicación resultan en una alta cantidad de folículos (Novoa *et al.*, 1999).

La colección de embriones de ovulaciones naturales (sin tratamiento de super ovulación) es una alternativa eficiente para producir crías a través de la transferencia de embriones en camélidos sudamericanos (Von Baer *et al.*, 2003), obteniéndose una tasa de recuperación de embriones de alpaca de 58.3% (Pacheco *et al.*, 2016), y de 60% en llamas, realizando la colecta de embriones fuera de época reproductiva (Pacheco *et al.*, 2015).

Bajo tales consideraciones, el presente estudio tuvo como objetivos evaluar la tasa de recuperación embrionaria, la calidad de los embriones de llama colectados de super ovulación y ovulación simple, y la fertilidad y natalidad de la transferencia de embriones frescos durante la época reproductiva y no reproductiva bajo condiciones de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Ejecución y Animales

El trabajo fue desarrollado en la Estación Experimental IVITA Maranganí – Fundo La Raya, de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ubicada en la región agroecológica de puna húmeda, Cusco, Perú, a 4200 msnm.

Se utilizaron 45 llamas como donadoras de embriones, adultas (5-9 años), con peso vivo promedio de 100 kg, adecuado historial reproductivo y mantenidas sobre pasturas naturales. Los animales fueron distribuidos en dos grupos, según el tipo de producción de embriones: Grupo I, ovulación simple, n=30) y Grupo II, super ovulación, n=15. Las hembras del grupo I fueron sometidas a lavado uterino hasta en tres oportunidades, las hembras del grupo II solo fueron sometidas por

dos oportunidades; sin embargo en ambos grupos se descartaron algunas hembras que presentaron problemas como metritis. Además, se utilizaron 89 hembras receptoras. Todas las hembras utilizadas (donadoras y receptoras) fueron seleccionadas previa evaluación ecográfica ovárica, debiendo tener folículos preovulatorios, ausencia de metritis y de quistes foliculares o luteales, amplitud de pelvis, condición corporal 2-3 y cría en pie. Todas fueron mantenidas en pasturas naturales y condiciones de campo. La transferencia a las receptoras se hizo a los 8 días pos-inducción de la ovulación. Para las evaluaciones ecográficas se utilizó un ecógrafo portátil, con un transductor lineal transrectal de 5 MHz, marca Esaote-Pie Medical, Modelo Tringa Linear® (Italia).

Se consideró época reproductiva a los meses de diciembre a abril (temporada lluviosa) y época no reproductiva a los meses de mayo a noviembre (temporada seca). Los lavados uterinos para colectar embriones y las transferencias fueron realizados directamente en el campo, bajo un cobertizo, simulando las condiciones de crianza del productor altoandino promedio.

Tratamientos

Para la ovulación simple, las hembras donadoras fueron ecografiadas el día 0, determinando la presencia de un folículo preovulatorio, el día 1 se empadraron con un macho de fertilidad comprobada, el día 8 se realizó la colecta y transferencia embrionaria y el día 28 se realizó el diagnóstico de gestación mediante ecografía.

Para la super ovulación se realizó la verificación de la presencia de folículo preovulatorio mediante ecografía. En el día 1 se administró 8.4 µg de acetato de buserelina (Conceptase®, Agrovvet Market) (día 1), el día 4 se aplicó 500 UI de eCG (Novormon®, Syntex), el día 8 se aplicó análogo de PgF_{2α} (0.025 mg) (Prostal®, Agrovvet Market) para inducir luteólisis, el día 11 se realizó la prime-

ra monta natural y se aplicó 8.4 µg de acetato de buserelina (Conceptase®, Agrovvet Market) en presencia de un folículo preovulatorio (>7 mm), en el día 12 se repitieron las montas, en el día 19 se realizó el lavado uterino para recuperar los embriones y realizar la transferencia, y el día 39 se realizó el diagnóstico de gestación mediante ecografía.

Previo al lavado se aplicó 0.2 mg/kg de xilacina (Xilagal®, Galmedic) vía IM y 1 ml de lidocaína al 2% (Lidomic®, Microsules) vía epidural. Se realizó la técnica no quirúrgica mediante el uso de una sonda de Foley N.º 18 para el lavado uterino. Se utilizó 100 ml de medio por lavado (Boviflush®, Minitube) (tres lavados) y se recuperó el fluido en un filtro EmCon. Al término del lavado se aplicó a las hembras donadoras una dosis de análogo de prostaglandina.

Embriones y Transferencia

La búsqueda de los embriones se realizó con ayuda de un estereoscopio con platina temperada a 35 °C. Los embriones fueron colocados en medio de mantenimiento temperado (Holding®, Syngro). Solo se utilizaron para la transferencia aquellos embriones de grado 1, según la evaluación descrita por Trasorras *et al.* (2017), basada en la clasificación de Tibary *et al.* (1997, 2015).

La transferencia de los embriones se realizó por el método no quirúrgico, utilizando un aplicador de embriones con transfit de punta metálica. El embrión se colocó en una pajilla de 0.25 ml en medio de mantenimiento y se depositó en el cuerno izquierdo (Carnero *et al.*, 2011).

Parámetros Evaluados

Para evaluar la tasa de recuperación embrionaria en ambas técnicas se determinó el número de embriones colectados entre el total de hembras lavadas, número de embri-

nes por lavado y número de lavados exitosos (presencia de embrión) entre el número total de hembras lavadas.

Los embriones colectados por los dos métodos fueron clasificados como Grado I: embriones esféricos, color homogéneo y bordes lisos; Grado II: embriones con arrugas, muy desarrollados (>700 µm) y con contorno anormal; Grado III: embriones visiblemente colapsados (Trasorras *et al.*, 2017), con lesiones visibles en su estructura y, por lo tanto, considerados como no transferibles.

La fertilidad de la transferencia de embriones se determinó mediante ecografía, usando un ecógrafo portátil y un transductor lineal de 5MHz (Tringa Linear®, Esaote), 20 días después de la transferencia embrionaria, confirmando gestación temprana con la presencia de vesícula embrionaria y cuerpo lúteo. La natalidad se determinó por el número de hembras que parieron respecto al número de hembras que fueron transferidas.

La evaluación de datos se realizó mediante estadística descriptiva, usando el programa SAS V9.0 (SAS, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la tasa de colección embrionaria para ovulación simple y super ovulación en llamas se presentan en el Cuadro 1, la calidad de los embriones recuperados en el Cuadro 2 y el porcentaje de gestaciones en el Cuadro 3.

La tasa de colección de embriones está influenciada por el método de producción de estos. Mediante la técnica de ovulación simple se colectaron embriones en el 53% (44/83) de hembras lavadas, mientras que con la técnica de super ovulación se obtuvieron 242.3% (63/26) de embriones con relación al número de hembras lavadas. Este resultado

Cuadro 1. Tasa de colección de embriones de llama de ovulación simple y super ovulación en época reproductiva y no reproductiva

	Ovulación simple		Super ovulación	
	Época reproductiva	Época no reproductiva	Época reproductiva	Época no reproductiva
N° embriones/N° lavados	32/56	12/27	47/19	16/7
Embriones por lavado (n)	0.57	0.44	2.47	2.28
		0.53		2.42
N° lavados exitosos/N° lavados	32/56 (57.14)	12/27 (44.41)	13/19 (68.42)	5/7 (71.42)
Tasa de colección (%)	57.14	44.41	247.7	228.5
Total		44/83 53%		63/26 242.3%

Cuadro 2. Calidad de los embriones colectados en época reproductiva y no reproductiva en llamas

	Ovulación Simple		Super ovulación	
	Época reproductiva	Época no reproductiva	Época reproductiva	Época no reproductiva
Grado I (%)	29 (90.6)	10 (83.3)	36 (76.6)	14 (87.5)
Grado II (%)	3 (9.4)	2 (16.7)	7 (14.9)	2 (12.5)
Grado III (%)	0	0	4 (8.5)	0
Total	32	12	47	16

es esperado, toda vez que la super ovulación produce mayor cantidad de estructuras embrionarias (Vaughan *et al.*, 2013). El número promedio de embriones por lavado para la técnica de ovulación simple fue de 0.57 en la época reproductiva y de 0.44 en época no reproductiva. Pacheco *et al.* (2016) obtuvie-

ron resultados similares para la época reproductiva, pero mayores en la época no reproductiva. En forma similar, Von Baer *et al.* (2003) encontraron diferencia entre las colectas embrionarias de verano (época reproductiva) con 76.8%, frente a la primavera (época no reproductiva) con 61.8% en

Cuadro 3. Porcentaje de hembras gestantes (fertilidad) y natalidad como resultado de la transferencia de embriones en llamas

	Ovulación Simple		Super ovulación	
	Época reproductiva	Época no reproductiva	Época reproductiva	Época no reproductiva
Fertilidad (%)	62.5	50.0	50.0	61.5
Preñadas/transferidas	56.4 (22/39)		56 (28/50)	
Natalidad (%)	41.0		30.0	
Paridas/transferidas	16/39		15/50	

ovulación simple, indicando las la influencia de la época sobre la eficiencia y comportamiento sexual de la alpaca (Pollard *et al.*, 1995). De otra parte, si bien se observa una marcada diferencia en el número de embriones y la tasa de colección entre ambas técnicas (ovulación simple vs. super ovulación), la técnica de ovulación simple es menos costosa (Von Baer *et al.*, 2003).

Respecto a la técnica de ovulación simple, Taylor *et al.* (2000) reportan 55% de colección de embriones al realizar el lavado uterino en el día 7; resultado similar al presente estudio al considerar las recuperaciones de ambas épocas. Es posible que la colecta embrionaria en el día 7 pos-monta no permita incluir el descenso embrionario en todas las donadoras, si se consideran los resultados de Taylor *et al.* (2000) quienes obtienen 79% de recuperación de embriones al realizar el lavado uterino el día 8 pos-monta. En este sentido, Picha *et al.* (2013) indican que el descenso embrionario en alpacas se inicia el día 6 pos-ovulación (7 días pos-monta).

Por otro lado, este estudio fue realizado en condiciones de altura y sin mejoras de alimentación, lo cual podría haber afectado la tasa de colecta, dado que el estudio de Taylor *et al.* (2000) se hizo en llamas de rebaños comerciales bajo semi-estabulación en con-

diciones de EEUU. Así mismo, los resultados obtenidos en ovulación simple también fueron inferiores al 68.9% reportado por Von Baer *et al.* (2003) en llamas mantenidas en semi-estabulación, evidenciando también que dicho sistema de crianza proveería mejores condiciones para la obtención de mayores tasas de colección embrionaria.

La super ovulación produce bajas tasas de recuperación embrionaria y una gran variabilidad de respuesta en camélidos sudamericanos (Ratto *et al.*, 2013), habiéndose desarrollado diversos protocolos, utilizando eCG y FSH como hormonas super ovulatorias. En el presente estudio se pudo obtener 2.42 embriones utilizando 500 UI de eCG, resultado muy similar a los dos embriones reportados por Pacheco *et al.* (2019) utilizando también 500 UI de eCG en una sola aplicación. De otra parte, Vaughan *et al.* (2013) reportaron la colección de 2.5 embriones por lavado en alpacas super ovuladas bajo condiciones medioambientales diferentes a la del actual trabajo.

Carretero *et al.* (2010) indican promedios de colección embrionaria de 2.9 y 2.6 embriones por hembra en llamas, pero utilizando dosis elevadas de eCG (1000 UI), lo cual fue el doble de la concentración usada en el presente trabajo (500 UI); sin embargo,

es importante indicar el mayor peso de las llamas argentinas (140 kg) que se encontraban en semi-estabulación y que la colección de embriones se hizo a los 8 días de la monta. Eso último apoya los resultados de Cervantes *et al.* (2011), quienes indican que los embriones producto de la super ovulación comienzan a ingresar al útero desde el día 6 de la monta, por lo cual el día 8 sería indicado para realizar la recuperación embrionaria. El porcentaje de lavados exitosos fue de 68.42 y 71.42% para la época reproductiva y no reproductiva respectivamente, logrando un promedio anual de 69.2% (18/26), resultado superior al de Ratto *et al.* (2013), quienes indican 53% de lavados exitosos en alpacas super ovuladas.

Los resultados sobre la calidad embrionaria indican 90.6 y 83.3% de Grado I y 9.4 y 16.7% de Grado II para las épocas reproductiva y no reproductiva, respectivamente, y 0 embriones para Grado 3 (Cuadro 2) para las recuperaciones utilizando la ovulación simple, esto último de acuerdo con otros reportes (Pineda *et al.*, 2012; Pacheco *et al.*, 2016). En el caso de embriones de super ovulación se obtuvo 76.6 y 87.5% de Grado I; 14.9 y 12.5% de Grado II y 8.5 y 0% de Grado II para las épocas reproductiva y no reproductiva, respectivamente (Cuadro 2), siendo similares entre épocas, excepto en el Grado III; resultados superiores a lo reportado por Vaughan *et al.* (2013), quienes indican incluso embriones de Grado IV, debido al empleo de una clasificación diferente a la del presente estudio. En este sentido, Pérez *et al.* (2019) reportaron un mayor porcentaje de embriones de ovulación simple en la categoría 2 (65.1%) mientras que solo obtuvieron 14.8% en las categorías 1 y 3 utilizando el manual del IETS para su evaluación (Stringfellow y Givens, 2011), donde no existen parámetros para evaluación de embriones de camélidos sudamericanos y, por lo tanto, estos datos no son comparables a los del presente estudio.

Todas las transferencias fueron realizadas en receptoras a los 8 días de la inducción de ovulación mediante la aplicación de 8.4 μ g de acetato de busserelina (Bourke *et al.*, 1995), lo cual fue diferente a lo empleado en otros estudios, donde hicieron la transferencia a los 6 (Trasorras *et al.*, 2010) y 7 días (Carnero *et al.*, 2011) de la inducción de la ovulación. Las tasas de fertilidad como producto de la ovulación simple (56.4%) y de la super ovulación (56%) fueron similares (Cuadro 3). Este resultado es inferior al obtenido por Carnero *et al.* (2011), quienes indican 75% de fertilidad al transferir el embrión directamente en el cuerno izquierdo, tal como se realizó en el presente experimento; aunque ligeramente superior al 50% obtenido por Trasorras *et al.* (2010). Es posible que la transferencia haya sido hecha tardíamente, no permitiendo un correcto reconocimiento maternal del embrión (Tibary *et al.*, 2015). En otros estudios, Taylor *et al.* (2000) reportan 66% de gestaciones en llamas semi-estabuladas, y Vaughan *et al.* (2013) reportaron 42.7 y 41.7% de fertilidad en alpacas para ovulación simple y super ovulación, respectivamente ambos estudios en condiciones muy diferentes a las del presente estudio.

La natalidad fue de 41.0% (16/39) y de 30.0% (15/50) para las llamas con ovulación simple y super ovulación, respectivamente, siendo similar a lo descrito en alpacas (Vaughan *et al.*, 2013), existiendo una disminución en el número de hembras paridas respecto al número de hembras preñadas, lo cual sugiere la presencia de mortalidad embrionaria y pérdidas fetales a lo largo de todo el periodo de gestación.

CONCLUSIONES

- Se puede obtener embriones de calidad transferible con las técnicas de ovulación simple y super ovulación.
- La técnica de super ovulación produce mayor cantidad de embriones, pero es dependiente de un protocolo más largo e

incluye el uso de varias hormonas y evaluaciones ecográficas, lo que la hace más complicada para su implementación a nivel de productor en zonas alejadas.

- La calidad de embriones de llama obtenidos por las dos técnicas es similar, siendo mayormente de Grado I.
- El porcentaje de fertilidad en las hembras receptoras fue similar con embriones producidos por las técnicas de ovulación simple y super ovulación.

LITERATURA CITADA

1. **Bourke DA, Adam CE, Kyle CE, McEvoy TG. 1994.** Ovarian response to PMSG and FSH in llamas. In: First European Symposium on South American Camelids, Bonn, Germany.
2. **Bourke DA, Kyle CE, McEvoy TG, Young P, Adam CL. 1995.** Recipient synchronization and embryo transfer in south American camelids. *Theriogenology* 43: 171.
3. **Carnero S, Huanca W, Cordero A, Vásquez M, Huanca T. 2011.** Transferencia embrionaria ipsilateral y contralateral a la posición del cuerpo lúteo y supervivencia embrionaria en llamas. *Rev Inv Vet Perú* 22: 114-120. doi: 10.15381/rivep.v22i2.278
4. **Carretero MI, Miragaya M, Chaves MG, Gambarotta M, Agüero A. 2010.** Embryo production in superstimulated llamas pre-treated to inhibit follicular growth. *Small Ruminant Res* 88: 32-37. doi: 10.1016/j.smallrumres.2009.11.006
5. **Cervantes M, Huanca W, Gonzales M, Palomino M, Leyva V. 2011.** Relación entre el día de colección y de la recuperación de embriones en alpacas superovuladas. *Rev Inv Vet Perú* 22: 125-132. doi: 10.15381/rivep.v22i2.282
6. **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
7. **Huanca WL. 2005.** Aplicación de biotecnologías reproductivas en especies domésticas y silvestres de camélidos sudamericanos. *Agrociencia* 9: 505-509.
8. **Huanca T, Sumar J, Naveros M, Cárdenas O, Gonzales M, Mamani R. 2012.** Twin reciprocal embryo transfer between alpacas and llamas. In: ICAR Satellite Meeting on Camelid Reproduction. Vancouver, Canada.
9. **Novoa C, Franco E, García W, Pezo D. 1999.** Dosis de gonadotropinas (eCG y hCG), superovulación y obtención de embriones. *Rev Inv Vet Perú* 10: 254-259. doi: 10.15381/rivep.v10i1.6616
10. **Pacheco JI, Tollig S, Von Walter A, Pezo D, Vélez V. 2015.** Colección repetida de embriones y transferencia interespecie entre alpacas y llamas durante época no reproductiva. *Spermova* 5: 6-9. doi: 10.18548/asp/0002.1
11. **Pacheco JI, Vélez V, Pezo D. 2016.** Evaluación de la eficiencia de la transferencia de embriones interespecie entre alpacas y llamas obtenidas por ovulación simple. *Rev Inv Vet Perú* 27: 64-69. doi: 10.15381/rivep.v27i1.11464
12. **Pacheco JI, Vélez VM, García, W. 2019.** Evaluación de un protocolo modificado de superovulación en llamas: buscando disminuir los problemas post superovulación. En: XIII Simposio Internacional de Reproducción Animal-IRAC, Córdoba, Argentina.
13. **Pérez UH, Gonzales E, Huayta R, Apaza M, Quispe Y, Pérez G. 2019.** Factores que afectan la transferencia de embriones de alpacas (*Vicugna pacos*) a llamas (*Lama glama*). *Rev Inv Vet Perú* 30: 1645-1652. doi: 10.15381/rivep.v20i4.17276
14. **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

15. **Pineda J, Pozo A, Huanca T, Naveros MI. 2012.** Recuperación sucesiva de embriones y retorno folicular post lavado en alpacas (*Vicugna pacos*) Huacaya donadoras naturales. *Spermova* 2: 53-54.
16. **Pollard JC, Littlejohn RP, Moore GH. 1995.** Seasonal and other factors affecting the sexual behaviour in alpacas. *Anim Reprod Sci* 37: 349-356. doi: 10.1016/0378-4320(94)01339-N
17. **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
18. **SAS. 2002.** User's Guide: Statistics, Version 9. SAS Inst. USA.
19. **Stringfellow D, Givens D. 2011.** Manual of the international embryo transfer society: a procedural guide and general information of the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures. 4th ed. Illinois, USA: 242 p.
20. **Sumar JB. 2013.** Embryo transfer in domestic South American camelids. *Anim Reprod Sci* 136: 170-177. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.10.029
21. **Taylor S, Taylor PJ, James AN, Godke RA. 2000.** Successful commercial embryo transfer in the llama (*Lama glama*). *Theriogenology* 52: 344.
22. **Tibary A, Anouassi A. 1997.** Theriogenology in camelids. Anatomy, physiology, pathology and artificial breeding. In: Actes editions, Institut Agronomique et Veterinaire Hassan II. Morocco. 438 p.
23. **Tibary A, Pearson LK, Campbell A. 2015.** Embryo transfer in camelids. *Spermova* 5: 234-252.
24. **Trasorras V, Chaves MG, Neild D, Gambarotta M, Aba M, Agüero A. 2010.** Embryo transfer technique: factors affecting the viability of the corpus luteum in llamas. *Anim Reprod Sci* 121: 279-285. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.06.004
25. **Trasorras VL. 2012.** Producción de embriones *in vivo* e *in vitro* en camélidos sudamericanos. *Spermova* 1: 19-21.
26. **Trasorras VL, Chavez MG, Carretero MI, Miragaya MH. 2012.** Ovarian superovulation in South American camelids. In: ICAR Satellite Meeting on Camelid Reproduction. Vancouver, Canada.
27. **Trasorras V, Carretero MI, Neild DM, Chaves MG, Giuliano MS, Miragaya MH. 2017.** Production, preservation and transfer of South American camelid embryos. *Front Vet Sci* 4: 190 doi: 10.3389/fvets.2017.00190
28. **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
29. **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 alpaca (*Lama pacos*) en un programa de transferencia de embriones. En: III Congreso Mundial sobre Camélidos. Potosí, Bolivia.