

RELACIÓN ENTRE EL DÍA DE COLECCIÓN Y LA RECUPERACIÓN DE EMBRIONES EN ALPACAS SUPEROVULADAS

RELATIONSHIP BETWEEN DAY OF COLLECTION AND EMBRYO RECOVERY IN SUPEROVULATED ALPACAS

Miriam Cervantes F.¹, Wilfredo Huanca L.^{1,2}, Mario Gonzales C.³, Manuel Palomino C.⁴, Víctor Leyva V.¹

RESUMEN

Se estudió la relación entre el día de colección y la recuperación embrionaria en alpacas adultas múltiparas. Alpacas con folículos ≥ 7 mm se sometieron a un protocolo de superovulación, se cubrieron con machos fértiles (día 0 = día de servicio), y los embriones se recuperaron en el día 5 (G1), 6 (G2) y 7 (G3) post cópula, previa evaluación del número y tamaño de los cuerpos lúteos por ecografía transrectal ovárica. En el Exp. 1 se usaron 14 alpacas, que fueron sacrificadas para recuperar los embriones de los cuernos uterino y del oviducto. En el Exp. 2 se realizó la recuperación embrionaria *in vivo* a 21 alpacas. El lavado de los cuernos uterinos se hizo con 250 ml de PBS a través de un catéter Foley y en los oviductos se hizo con 20 ml de PBS desde la unión útero tubal hacia la fimbria. El número de embriones recuperados de cuerno uterino así como el porcentaje de recuperación embrionaria fue mayor en G2 y G3 respecto a G1 ($p < 0.05$), mientras que en el oviducto hubo mayor recuperación en G1. Los embriones recolectados de los cuernos uterinos considerados como buenos y excelentes fue de 81.4% (35/43) en el Exp. 1 y de 74.5% (38/51) en el Exp. 2, sin encontrar diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada experimento. El estadio de desarrollo embrionario más frecuente en ambos experimentos fue de blastocisto eclosionado (77.7%, 73/94), sin diferencia estadística entre G2 y G3. Se concluye que los embriones pueden ser recuperados del oviducto hasta el día 5 y del cuerno uterino desde el día 6 post cópula.

Palabras clave: alpaca, eCG, día de colección, recuperación embrionaria, cuerno uterino, oviducto

ABSTRACT

The relationship between day of collection and embryo recovery was studied in multiparous adult alpacas. Females with ≥ 7 mm follicles were superovulated, mated with fertile males (day 0 = day of service) and embryos were recovered on day 5 (G1), 6 (G2)

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

² E-mail: whuanca2002@yahoo.com

³ C.I.P. Quimsachata, Estación Experimental ILLPA-Puno, INIA

⁴ Laboratorio de Reproducción Animal y Mejoramiento Genético, EFP Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho

and 7 (G3) post copula, where the number and size of corpora lutea were echographically evaluated. In Exp. 1, 14 females were slaughtered and embryos were recovered from the uterine horns and the oviduct. In Exp. 2, embryos were recovered *in vivo* from 21 females. Each uterine horn was flushed with 250 ml of PBS using a Foley catheter; and oviducts were flushed from the utero-tubal junction to the fimbria using 20 ml of PBS. The number and rate of embryos recovered from the uterine horns was higher in G2 and G3 as compared to G1 ($p < 0.05$), while in the oviduct was higher in G1. Collected embryos from uterine horns had the condition of excellent and good in 81.4% (35/43) in Exp. 1 and 74.5% (38/51) in Exp. 2, and without statistical differences between treatments in each experiment. The most frequent level of embryo development was hatching blastocyst (77.7%, 73/94), and without differences between G2 and G3. It was concluded that embryos could be recovered until day 5 after mating in oviducts and from day 6 onwards in the uterine horns.

Key words: alpaca, eCG, collection day, embryo recovery, uterine horn, oviduct

INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones (TE) como técnica de apoyo a programas de mejoramiento genético ha mostrado ser de gran utilidad en la ganadería lechera (Wiggans, 1991), de allí que su adaptación en alpacas tendría similares beneficios (Adams y Ratto, 2001); sin embargo, estudios empleando **diversos esquemas y metodologías** (Novoa *et al.*, 1999; Velásquez y Novoa, 1999; Palomino, 2000; Huanca, 2005a) reportan resultados pobres y variables en el número de embriones recuperados (Cervantes, 2008). Los factores que estarían afectando los resultados podrían circunscribirse a las diferencias en la técnica de superovulación y en el día de recuperación de los embriones.

Así, en estudios de Huanca en alpacas (2005a,b), usando las mismas técnicas de superovulación con eCG y día de colección (día 7 post cópula) empleadas en llamas (Huanca *et al.*, 2004), obtuvo una respuesta ovárica promedio de 7.5 cuerpos lúteos; sin embargo, la recuperación embrionaria fue de solo de 1.4 embriones, similar a lo obtenido por Novoa *et al.* (1999). Estos resultados hacen suponer que la pérdida de embriones podría ser consecuencia de los estadios avanzados de desarrollo; guardando coherencia con los resultados de Bravo *et al.* (2004) quienes encontraron estadios más avanzados de

desarrollo en alpacas tratadas con eCG a diferencia de alpacas no tratadas. Asimismo, se dispone de reportes sobre la recuperación de embriones a nivel de oviducto al día 3 y 4 post cópula (Aparicio *et al.*, 2003).

En base a estas inferencias, se planteó modificaciones en los esquemas hormonales y en los días de colección, con el propósito de estudiar la relación entre el día de colección y la recuperación de embriones, a fin de obtener un mayor número de embriones por hembra donante para su utilización en los programas de mejoramiento genético en alpacas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento Experimental

El estudio se realizó en el Centro de Investigación y Producción Quimsachata, Estación Experimental ILLPA-INIA, ubicado a 4200 msnm en el distrito de Santa Lucía, Puno. La parte experimental se realizó durante los meses de enero y febrero de 2007 (Experimento 1) y de 2008 (Experimento 2).

Se utilizaron 35 alpacas Huacaya hembras adultas (6 a 8 años de edad), con historia de partos normales y con presencia de un folículo mayor o igual a 7 mm, detectado por ecografía ovárica transrectal. Se usaron ma-

chos adultos (?4 años de edad) de reconocida fertilidad para el servicio. Todos los animales fueron alimentados en pastura natural.

Se realizó dos fases experimentales en un diseño completamente aleatorio. Las alpacas fueron sometidas a un mismo protocolo de superovulación y determinados días de colección de embriones después de la cópula. La evaluación de la presencia de un folículo preovulatorio ?7 mm que permita iniciar el protocolo de superovulación se hizo con un ecógrafo ALOKA SSD 500 y transductor lineal de 7.5 MHz.

El protocolo de superovulación fue una modificación del protocolo de Huanca (2005a,b). Se administró 650 UI de eCG dos días después de la ovulación inducida con 1 ml de GnRH im (0.0042 mg acetato de buserelina), cinco días después se indujo la luteólisis con 1 ml de PGF_{2?} im (0.25 mg cloprostenol), y al día siguiente se evaluó el número y el tamaño de folículos ováricos por ecografía transrectal y se procedió al servicio (>15 min) con macho fértil. En la cópula se controló la correcta penetración del pene del macho. Al final del servicio, las hembras recibieron 1 ml im de GnRH (0.0042 mg acetato de buserelina).

Las alpacas servidas se distribuyeron al azar según día de colección de embriones (día 0 = día de servicio) en tres grupos experimentales: día 5 (G1), 6 (G2) y 7 (G3). Previo a la recuperación embrionaria, se evaluó el número y tamaño de los cuerpos lúteos por ecografía transrectal ovárica.

Experimento 1

Se emplearon cuatro alpacas por tratamiento. Los animales se sacrificaron el día de la recuperación embrionaria y el tracto reproductivo se removió cuidadosamente. El lavado de los cuernos uterinos se hizo con la técnica de lavado uterino transcervical correspondiente al método de recuperación por circuito abierto con flujo discontinuo descrito en bovinos (Palma, 2008). Se evaluó la cali-

dad morfológica y estadio de desarrollo embrionario, tomando como referencia las clasificaciones establecidas por Lehn-Jensen (citado por Callesen *et al.*, 1995). Asimismo, se registró el tamaño de los embriones.

Además, se procedió al lavado de los oviductos para comprobar la presencia de embriones en oviductos entre el día 5 a 7 post cópula. Se diseccionó el mesosalpinx para eliminar la forma tortuosa del oviducto y facilitar el lavado. Se inyectó 10-15 ml de medio de lavado temperado (37 °C) a base de PBS a nivel de la unión útero-tubal, recuperándose el líquido por el extremo opuesto (fimbria) sobre una placa petri estéril grande (previamente rayada).

Experimento 2

La recuperación embrionaria fue *in vivo* (método no quirúrgico), utilizando siete animales por tratamiento. El lavado de los cuernos uterinos se hizo en formal similar al Experimento 1. Sin embargo, en este caso, se colocó anestesia epidural a nivel de la base de la cola (lidocaina al 2%) y se desinfectó la zona vulvar; además, al término del lavado de los cuernos uterinos, las alpacas recibieron 1 ml im de PGF_{2?} (0.25 mg cloprostenol). El proceso de identificación y clasificación de los embriones fue similar al Experimento 1.

Evaluaciones

Se evaluó la calidad morfológica y del estadio de desarrollo de los embriones recuperados, el porcentaje de recuperación de embriones (considerando el número de embriones recuperados por lavado uterino transcervical entre el número de cuerpos lúteos detectados ecográficamente el día de la recuperación embrionaria), y el porcentaje de ovulación (considerando el número de cuerpos lúteos detectados el día de la recuperación embrionaria entre el número de folículos superestimulados ?7 mm previos a la cópula). Se empleó la diferencia de proporciones para establecer la significancia estadística entre los grupos.

El número de folículos superestimulados ≥ 7 mm previo a la cópula, número de cuerpos lúteos y número de embriones recuperados por grupo se evaluó empleando la prueba de Kruskal Wallis. El tamaño de los folículos y cuerpos lúteos se evaluó con la prueba de ANOVA de una vía. El tamaño de los embriones se evaluó con la prueba T Student independiente. Asimismo, se determinó el coeficiente de correlación entre el número promedio de cuerpos lúteos observados y el de embriones recuperados en los grupos en estudio.

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico Stata 9.2 (StataCorp, Texas, USA), y las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

El número promedio de embriones recuperados de cuerno uterino, así como el porcentaje de recuperación embrionaria fue significativamente mayor en G2 y G3, respecto a G1 ($p < 0.05$), pero sin diferencias estadísticas entre G2 y G3 en ambos experimentos (Cuadro 1). En tres alpacas del G1 (Exp. 2) se hizo un segundo lavado transcervical al día siguiente encontrando más de un embrión. A nivel de oviducto, el número de embriones fue mayor para G1 (Cuadro 1). Se observó una gran variabilidad individual en el número de embriones recuperados, llegándose a obtener hasta 11 embriones en una hembra.

Cuadro 1. Recuperación embrionaria en tractos reproductivos de alpacas luego del sacrificio (Experimento 1, $n = 4$, 2007) y por método no quirúrgico (Experimento 2, $n = 7$, 2008)

Día de recuperación de embriones post cópula	Embriones en oviducto		Embriones en cuerno uterino		Relación entre embriones de cuernos y CL
	Prom. \pm d.e.	n	Prom. \pm d.e.	n	
Experimento 1					
5	2.3 ± 0.4^a	9	0.2 ± 0.5^a	1	12.5 ± 25.0^a
6	0.4 ± 0.5^a	2	3.8 ± 4.0^b	19	61.7 ± 23.1^b
7	0.2 ± 0.4^a	1	4.6 ± 1.1^b	23	42.9 ± 30.9^b
Experimento 2					
5			0^a	0	0^a
6			4.3 ± 2.4^b	30	46.8 ± 21.7^b
7			3.0 ± 2.9^b	21	35.7 ± 27.0^b

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de experimentos y en una misma columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$)

Cuadro 2. Tamaño (mm) de embriones recuperados en tractos reproductivos de alpacas luego del sacrificio (Experimento 1, n = 4, 2007) y por método no quirúrgico (Experimento 2, n = 7, 2008)

Día de recuperación de embriones post cópula	Embriones en oviducto		Embriones en cuerno uterino	
	n	Prom. \pm d.e.	n	Prom. \pm d.e.
Experimento 1				
5	9	0.169 \pm 0.019 ^a	1	0.200
6	2	0.165 \pm 0.02 ^a	19	0.223 \pm 0.039 ^a
7	1	0.160	23	0.411 \pm 0.147 ^b
Experimento 2				
5			0	0
6			30	0.248 \pm 0.052 ^a
7			21	0.470 \pm 0.220 ^b

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de experimentos y en una misma columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$)

La calidad morfológica de los embriones recolectados de los cuernos uterinos considerados como buenos y excelentes fue del 81.4% (35/43) en el Experimento 1 y de 74.5% (38/51) en el Experimento 2, y del 100% en embriones recuperados del oviducto (12/12), sin encontrar diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada experimento. En total, el 80.2% de los embriones recuperados presentó una calidad de bueno a excelente (85/106).

El estadio de desarrollo embrionario más frecuente en ambos experimentos fue de blastocisto eclosionado (77.7%, 73/94), no encontrándose diferencia entre los grupos G2 y G3, mientras que en G1 se recuperó un solo embrión. La frecuencia de blastocistos eclosionados en el Experimento 1 fue de 72.1% (31/43) y en el Experimento 2 fue de 82.4% (42/51). A nivel de oviducto, de los 12 embriones recuperados, 9 (75%) se encon-

traban en estadio de mórula compacta. El tamaño de los embriones fue significativamente mayor en el día 7 (G3) que en el día 6 (G2) post cópula en ambos experimentos ($p < 0.05$).

Se determinó que el número de folículos detectados previo a la monta y el número de cuerpos lúteos detectados el día de la recuperación embrionaria estaban moderadamente correlacionados ($r = 0.7$, $p < 0.05$); mientras que el número de cuerpos lúteos detectados y el número de embriones recuperados de útero tuvo una correlación baja ($r = 0.4$, $p < 0.05$).

DISCUSIÓN

El número de embriones recuperados de cuerno uterino fue significativamente menor en G1, toda vez que solo se halló un em-

brión. Sin embargo, se pudo encontrar nueve embriones a nivel de oviducto en comparación al bajo número encontrado en G2 (2) y G3 (1), aunque es posible que una parte del número total de embriones presentes en oviducto se halla perdido debido a fallas en la aplicación de la técnica de recuperación. No obstante, estos resultados indican que los embriones de las alpacas superovuladas del presente estudio estarían pasando del oviducto al útero luego del día 5 post cópula. Aparicio *et al.* (2003) reportaron la recuperación de embriones a nivel de oviducto al día 3 y 4 post cópula. El lavado transcervical en el día 6 post cópula, que no estuvo programado en el estudio, mostró la presencia de embriones, lo cual estaría demostrando que los embriones aun se encontraban en el oviducto al día 5 post cópula.

La calidad morfológica de los embriones recuperados en los grupos en estudio fue mayoritariamente de buena a excelente, aspecto importante considerando que la evaluación morfológica de la calidad embrionaria puede proveer de valiosa información para predecir las tasas de preñez post-transferencia, debido a que la transferencia de embriones de este tipo de embriones resultan en mayores tasas de preñez respecto a los embriones de mala calidad en vacas (Linder y Wrigh, 1983; Hasler, 2001), y a los de mediana calidad en ovinos (Angela *et al.*, 2006).

El mayor porcentaje de embriones se encontraba en estadio de blastocisto eclosionado, tanto al día 6 como al día 7 post cópula, y solo se encontró un embrión en estadio de mórula al día 5; resultado que difiere al estudio de Bravo *et al.* (2004), quienes reportan embriones en estadio de blastocisto al día 6 y blastocisto expandido al día 7. En el caso de vacas, los ovocitos producidos por hembras superovuladas no son liberados simultáneamente, sino dentro de un periodo de varias horas, lo que puede explicar la variación en el estadio de desarrollo de los embriones recuperados; es así que Callensen *et al.* (1986, citado por Palma, 2008) reportan que vacas estimuladas empiezan a ovular 24

horas después del pico de LH, pero la ovulación se prolonga aún más allá de las 33 horas, de modo que los ovocitos no son fecundados en el mismo momento. Así también, la variación de la respuesta superovulatoria puede estar asociada con el animal donador (Callesen *et al.*, 1995), incluyendo sus cualidades genéticas (Palma, 2008).

De igual manera, los resultados del presente trabajo indicarían que alpacas tratadas con eCG ocurriría un desarrollo embrionario acelerado respecto a otras especies, al encontrar embriones en estadio de blastocisto eclosionado desde el día 6 post cópula. Los blastocistos de los bovinos eclosionan a los 8 a 9 días post cópula (Palma, 2008) o a los 10 días post estro (Massip *et al.*, 1982). En llamas, McEvoy *et al.* (1992, citado por Ratto, 2005) refieren que el acelerado rango de desarrollo embrionario en camélidos sudamericanos podría estar relacionado con el temprano reconocimiento maternal de la preñez, el cual fue postulado en base a un descenso temporal de los niveles de progesterona, sugiriendo que los signos del embrión para su reconocimiento deberían ser transmitidos antes del día 10 post monta con el fin de mantener el cuerpo lúteo de la preñez (Aba *et al.*, 1997).

Por otro lado, el hecho que los embriones no presenten zona pelúcida podría indicar una mayor susceptibilidad de dañarse debido a su mayor fragilidad (Palma, 2008). Esto podría haber afectado el número total de embriones recuperados por lavado uterino transcervical en las alpacas superovuladas.

El número de embriones producidos es inherente a cada hembra donante, dependiendo en parte de los folículos que responden a la superovulación; asimismo, se considera que es improbable controlar los mecanismos intraováricos que determinan la dinámica folicular (Moor *et al.*, 1984). No obstante, la variación en el número de embriones recuperados por animal es un aspecto que no debiera ser ignorado (Merton *et al.*, 2003). Se dispone de estudios que señalan la posibili-

dad de seleccionar hembras donantes en base al número de folículos pequeños al comienzo del tratamiento superovulatorio, dada su estrecha correlación con la respuesta superovulatoria. De igual manera, se ha observado que ovejas con alto número de folículos en la primera onda folicular presentaron una mejor respuesta superovulatoria en términos de cuerpos lúteos y calidad embrionaria (Mossa *et al.*, 2007). Asimismo, se indica que el tipo de respuesta a un primer tratamiento superovulatorio tiende a ser similar en un segundo (Cordeiro *et al.*, 2002), tercero (Lamberson and Lambeth, 1986) e incluso a lo largo de diez tratamientos (Donaldson and Perry, 1983), aunque hay otros trabajos que reportan una baja repetibilidad y heredabilidad (Tonhati *et al.*, 1999).

La baja correlación entre el número de cuerpos lúteos y el número de embriones recuperados difiere de correlaciones en bovinos donde se reportan correlaciones mayores (Kanuya *et al.*, 1997).

CONCLUSIONES

Los embriones de alpacas superovuladas pueden ser recuperados del oviducto hasta el día 5, y de los cuernos uterinos desde el día 6 post cópula.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Proyecto PROCOM 2006 "Biotecnologías Reproductivas en el Mejoramiento Genético de Camélidos. Fase II" del CONCYTEC y al Sub Proyecto «Biotecnologías reproductivas como herramientas para la mejora genética de alpacas y llamas» INCAGRO – UNMSM, por el apoyo financiero; además agradecen a los profesionales, personal técnico y estudiantes presentes en el Centro de Investigación Illpa-Quimsachata, Puno, por la asistencia brindada durante la ejecución del trabajo.

LITERATURA CITADA

1. **Aba M, Bravo P, Forsberg M, Kindahl H. 1997.** Endocrine changes during early pregnancy in the Alpaca. *Anim Reprod Sci* 47: 273-279.
2. **Adams G, Ratto M. 2001.** Reproductive biotechnology in South American camelids. *Rev Inv Vet, Perú Supl* 1: 134-141.
3. **Angela S, Prefac G, Paul T, Alexandru S, Dana T. 2006.** Evaluation of sheep embryo quality by morphologic methods – advantages and disadvantages. *J Tekirdag Agric Faculty* 3(1): 68-70.
4. **Aparicio M, Leyva V, Novoa C, García W. 2003.** Efecto de la copulación durante el celo postovulatorio en la mortalidad embrionaria en alpacas. *Rev Inv Vet, Perú* 14(1): 24-32.
5. **Bravo W, Cosio E, Alarcón V, Ordoñez C. 2004.** The first 10 days of the alpaca embryo. En: 15th International Congress on Animal Reproduction. Brazil. p 84.
6. **Callesen H, Lovendahl P, Bak A, Greve T. 1995.** Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. *J Anim Reprod* 73: 1539-1543.
7. **Cervantes M. 2008.** Momento óptimo post cópula para la recuperación de embriones del útero de alpaca mediante método no quirúrgico. Tesis de Maestría. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 77 p.
8. **Cordeiro MF, Lima-Verde JB, Lopes-Júnior ES, Teixeira DIA, Farias LN, Salles HO, Simplicio AA, Rondina D, Freitas VJF. 2002.** Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. *Theriogenology* 57: 1263-1272.
9. **Donaldson LE, Perry B. 1983.** Embryo production by repeated superovulation of commercial donor cows. *Theriogenology* 20: 163-168.

10. **Hasler JF. 2001.** Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 56: 1401-1415.
11. **Huanca W. 2005a.** Aplicación de biotecnologías en el mejoramiento genético de llamas y alpacas. Fase I: Desarrollo y evaluación de un protocolo de transferencia de embriones. *CSI. Boletín* 55: 8-12.
12. **Huanca W. 2005b.** Aplicación de biotecnologías reproductivas en especies domésticas y silvestres de camélidos sudamericanos. *Agrociencia Vol. IX (1-2)*:505-509.
13. **Huanca W, Ratto M, Santiani A, Cordero A, Huanca T. 2004.** Embryo transfer in camelids: study of a reliable superovulatory treatment in llamas. In: 4th European Symposium on South American Camelids. Germany.
14. **Kanuya N, Callesen H, Hyttel P, Assey R, Greve, T. 1997.** Superovulatory response of dairy cattle (*Bos taurus*) in a tropical environment. *Theriogenology* 47(8): 1583-1593.
15. **Lamberson WR, Lambeth VA. 1986.** Repeatability of response to superovulation in Brangus cows. *Theriogenology* 26: 643-648.
16. **Linder GM, Wright RW. 1983.** Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20: 407-416.
17. **Massip A, Mulnard J, Vanderzwalmen P, Hanzen C, Ectors F. 1982.** The behaviour of cow blastocyst in vitro: cinematographic and morphometric analysis. *J Anat* 134: 399-405.
18. **Merton JS, de Roos APW, Mullaart E, de RuighL, Kaal L, Vos PL, Dieleman SJ. 2003.** Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59: 651-674.
19. **Moor RM, Kruipp ThAM, Green D. 1984.** Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation? *Theriogenology* 21: 103-116.
20. **Mossa F, Duffy P, Naitana S, Lonergan P, Evans A. 2007.** Association between numbers of ovarian follicles in the first follicle wave and superovulatory response in ewes. *Anim Reprod Sci* 100: 391-396.
21. **Novoa C, Franco E, García W, Pezo D. 1999.** Dosis de gonadotropinas (eCG y hCG), superovulación y obtención de embriones en alpacas. *Rev Inv Vet* 10: 48-53.
22. **Palma G. 2008.** Biotecnología de la reproducción. 2^a ed. Buenos Aires: Ed Producción Gráfica Integral. 669 p.
23. **Palomino H. 2000.** Biotecnología del trasplante y micromanipulación de embriones de bovinos y camélidos de los Andes. Perú: AFA Ed Importadores. 444 p.
24. **Ratto M. 2005.** Ovarian follicular synchronization, ovulation and oocyte development in llamas and alpacas. Thesis PhD. Canada: University of Saskatchewan. 185 p.
25. **Tonhati H, Lobo RB, Oliveira HN. 1999.** Repeatability and heritability of response to superovulation in holstein cows. *Theriogenology* 51: 1151-1156.
26. **Velásquez C, Novoa C. 1999.** Superovulación con PMSG aplicada en fase folicular y fase luteal en alpacas. *Rev Inv Vet* 10: 39-47.
27. **Wiggans G. 1991.** National genetic improvement programs for dairy cattle in the United States. *J Anim Sci* 69: 3853-3860.