BIOTECNOLOGIAS REPRODUCTIVAS EN CAMELIDOS SUDAMERICANOS DOMESTICOS: AVANCES Y PERSPECTIVAS

Wilfredo Huanca¹, Aída Cordero², Teodosio Huanca³ y Gregg P. Adams⁴

INTRODUCCIÓN

La crianza de los camélidos domésticos, alpacas y llamas, es una de las actividades de mayor importancia e impacto en el desarrollo socio económico de la población alto andina de nuestro país, no solo por su capacidad de adaptación a las difíciles condiciones medioambientales, alturas sobre los 4,000 metros snm, sino por su utilización como una fuente alimenticia de proteína de origen animal y medio de transporte y en el caso de la alpaca, como un recurso para la producción de fibra de buena calidad.

El Perú tiene más de 3 millones de alpacas (87 % de la población mundial) y la segunda población mundial en llamas con más de 1 millón de animales; sin embargo, Las deficiencias en los esquemas de crianza tradicional, como la crianza conjunta de alpacas y llamas, con los consiguientes cruzamientos no programados, han contribuido a disminuir la calidad genética de los animales, originando una pérdida en la cantidad y calidad de fibra, reportándose que el 45 % de la producción de fibra tiene una finura de 26.0 micras y el 46 % una de 33.0 micras y solo un 8 % presenta una fibra del 22.0 micras (Freyre G. 2006).

La aplicación de biotecnologías reproductivas como la Inseminación Artificial (IA) ha contribuido al progreso genético obtenido en especies domesticas como los bovinos de leche, contribuyendo a obtener los actuales niveles de producción láctea. En camélidos, la posibilidad de mejora genética de los rebaños de productores mediante la prueba de progenie, con la formación de núcleos de reproductores, requiere años de trabajo y esta limitada, entre otros factores, por el

largo intervalo generacional y la capacidad fisiológica de una hembra que solo puede tener hasta 4 crías, durante toda su vida reproductiva (Novoa C. 1999).

Los esfuerzos para el desarrollo y aplicación de biotecnologías reproductivas no siempre han sido desarrollados en forma programada y continua, sino como esfuerzos individuales y aislados e incluso algunos investigadores consideran que no es posible desarrollar y aplicar estas tecnologías por los pobres resultados obtenidos. Sin embargo, el desarrollo de estas biotecnologías ha requerido la mejora del conocimiento sobre la fisiología reproductiva de esta especie., contando con la ayuda de técnicas como la ultrasonografía.

El objetivo del presente trabajo es realizar una breve revisión del estado actual del conocimiento, sustentado en estudios realizados en nuestro país, especialmente en Inseminación Artificial, Transferencia de Embriones y Fertilización In Vitro; con el propósito de disponer de alternativas tecnológicas que puedan servir como herramientas para la mejora genética de los camélidos domésticos, alpacas y llamas; así como la posibilidad de su potencial uso en los camélidos no domésticos.

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

La IA con semen congelado es una de las más importantes tecnologías reproductivas en la producción de animales domésticos y combinada con una prueba de progenie, ha contribuido sustancialmente en el mejoramiento genético de bovinos lecheros, especialmente cuando fue posible disponer de semen congelado de toros de alta calidad genética. En camélidos, si bien existen reportes sobre el desarrollo de la IA y aun cuando puede ser considerada una alternativa tecnológica, aun no se han superado las limitantes existentes, como el desarrollo de protocolos de criopreservación, limitando por ahora al desarrollo de la Inseminación Artificial con el uso de semen fresco (Huanca y Adams 2007), con las consiguientes dificultades para permitir una amplia difusión de reproductores genéticamente superiores.

Existen diferencias fisiológicas entre los camélidos y otras especies domésticas, siendo una primera diferencia el hecho que las hembras camélicas

¹ Laboratorio de Reproducción Animal – Facultad de Medicina Veterinaria

Universidad Nacional Mayor de San Marcos

² Departamento de Nutrición – Facultad de Zootecnia – Universidad Nacional Agraria La Molina

³ Programa Nacional de Investigación en Camélidos – EE ILLPA – INIA – Puno

⁴ Veterinary Biomedical Sciences, Western Collage of Veterinary Medicine – University of Saskatchewan, Saskatoon Canada
E-mail: whuanca2002@yahoo.com

son especies de ovulación inducida, es decir que se requiere el estímulo de la copula para inducir ovulación (San Martín et al 1968), pero esta diferencia más que una dificultad puede ser una ventaja para la aplicación de la IA. Sin embargo, otras diferencias, como la dificultad para la colección de semen debido a las características de cópula de la hembra (posición y duración); así como el manejo del semen debido a su naturaleza viscosa; han sido los principales obstáculos para el desarrollo masivo de la IA, a los que hay que agregar la baja concentración de espermatozoides y el alto porcentaje de anormales (Fernández-Baca 1993).

Los reportes sobre métodos de colección de semen son diversos, desde el uso de sacos vaginales (Mogrovejo et al 1952), esponjas vaginales (San Martín 1961) y electroeyaculación (Fernández-Baca y Calderón 1965; Calderón W. 1968); con las consiguientes dificultades para los machos durante la copula y la calidad del semen. Posteriormente se reporta el uso de una vagina artificial adaptada de ovinos (Sumar J y Leyva V. 1981), que si bien mejora la técnica de colección, aún presenta dificultades para mantener una temperatura adecuada durante el largo de la cópula. El uso de una frazadilla eléctrica cubriendo la vagina Artificial, permite algunas mejoras en la técnica de colección, facilitando el mantenimiento de la temperatura (Gaully and Leindiger, 1996). Igualmente, el uso de un maniquí (Sumar y Leyva 1981) o la colección con hembra receptiva (Gaully and Leindiger 1996; Huanca y Gaully 2001) se presentan como alternativas para la colección de una muestra de semen fisiológicamente normal; sin embargo, se requiere un entrenamiento de los animales y no siempre todos los machos llegan a aceptar el maniquí; mientras que el uso de hembra receptiva genera incomodidades en el operador. Otras alternativas de colección incluyen la colección de semen mediante una fístula uretral (Pérez G. 2006) y una más reciente ha sido reportada por Giulano et al (2007) mediante la colección de semen con uso de electroeyaculación pero con una previa anestesia del animal, con resultados interesantes y sin contaminación del semen con orina.

Los estudios sobre conservación de semen no son totalmente satisfactorios, particularidades como la alta viscosidad del semen de alpacas y llamas (Lichtenwalner et al 1996; Bravo et al 1997) se constituyen en factores que dificultan el desarrollo de las técnicas de conservación., dificultando la determinación de la concentración, morfología y motilidad espermática, además del alto porcentaje de espermatozoides anormales (Fernández- Baca 1993) y una motilidad oscilatoria (Sumar y García 1986, Garnica et al 1993). Intentos para reducir la alta viscosidad ha sido reportada, mediante con el uso de enzimas como la colagenasa, hyaluronidasa y tripsina (Bravo W. et 2000) o mediante una acción mecánica (Valdivia M.

1999). Los resultados observados son variables y si bien con el uso de la enzima se observa motilidad espermática, esta característica no siempre se ha reflejado en mejoras en la tasa de preñez. Igualmente existe poca información sobre el uso de dilutores, reportándose el uso de Yema - citrato (Pacheco et al 1996), solución de Suero de Albúmina Bovina (BSA) y Glucosa (Huanca y Gaully 2001), Tris - Glucosa - Yema Huevo (Raymundo et al 2000).

El primer reporte sobre IA en alpacas fue realizado por Fernández-Baca y Novoa (1968), utilizando semen sin diluir de 2 vicuñas y 4 paco-vicuñas, obteniéndose una sola cría de 42 alpacas inseminadas. Posteriormente se ha reportado la inseminación de 83 alpacas y 11 llamas con semen fresco obtenido por electroeyaculación de una vicuña y 4 paco-vicuñas, con una tasa de 48 % en hembras inducidas a ovulación con Gonadotropica Corionica Humana (hCG) y 11 % en hembras inducidas a ovulación con machos vasectomizados (Leyva et al 1977). Igualmente se reporta una tasa de preñez del 73 % a la IA con semen fresco y depositado en los cuernos uterinos, así como un 67 % de preñez a la IA por laparoscopia (Bravo et al 1997), similar al reporte de Pacheco (1996). Sin embargo, todas esas experiencias fueron realizadas en centros experimentales, a diferencia de una experiencia a nivel de criadores particulares, donde se reporta una tasa de preñez del 51 % de 207 alpacas inseminadas con semen fresco diluido con una solución de BSA + Glucosa e induciendo la ovulación con un análogo de GnRH o LH, entre 24 a 26 horas antes de la Inseminación (Apaza et al 2001).

Los reportes sobre semen congelado son muy escasos; así tenemos que un estudio realizado con semen obtenido por electroeyaculación y diluido con Tris - Yema huevo - Glicerol, solo se observo un 10 % de motilidad pos descongelamiento (McEvoy et al 1992); así mismo, otro estudio con semen tratado con colagenasa y posteriormente diluido con citrato de sodio - Yema huevo - Glicerol (7 %) permite obtener una motilidad entre el 30 - 40 % (Bravo 1996). El uso de etilinglicol como agente crioprotector ha sido reportado, permitiendo una tasa de motilidad pos descongelamiento del 20 % (Santiani et al 2005). A pesar de estos resultados a la fecha no se ha reportado estudios que nos permitan señalar la factibilidad de congelar semen de camélidos. Posiblemente, como sucede con otras especies, no va a ser fácil congelar semen, más aún si a las dificultades de contar con un dilutor apropiado, hay que considerar los altos porcentajes de anormalidades presentes en los eyaculados.

Los resultados obtenidos sugieren que es posible la colección de semen con vagina artificial colocada en un maniquí y envuelta con una frazadilla eléctrica,

así como el desarrollo de la IA con semen fresco; sin embargo se requieren nuevos estudios que permitan desarrollar protocolos de criopreservación de semen, por lo que parece que el uso de la IA en camélidos va a estar, por ahora, restringido al uso de semen fresco diluido y utilizado inmediatamente, con resultados cercanos al 50 %.

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

En camélidos, el primer reporte sobre transferencia de embriones fue realizado por Sumar et al. (1974), posteriormente otros reportes confirman la factibilidad de la aplicación de la técnica pero con una variabilidad en la respuesta ovárica a los protocolos de superestimulación, así como la respuesta en número y calidad de embriones recuperados (Del Campo et al 1995).

La ultrasonografía ha contribuido a mejorar el conocimiento sobre la fisiología ovárica en especies domésticas ((Pierson and Ginther 1984) y no domésticas; contribuyendo al conocimiento de la dinámica folicular ovárica en llamas (Adams et al 1990) y alpacas (J. Vaughan 2001). La diferencia sustancial, como ocurre en las especies de ovulación inducida, que si no ocurre copula, el folículo dominante ingresa a una fase de regresión y se produce una nueva onda de crecimiento folicular (Sumar J. 2000).

La ovulación en alpacas y llamas puede ser inducida por la administración de hormonas exógenas como la Gonadotropina Corionica Humana (hCG), Hormona Liberadora de la Gonadotropina (GnRH) (Bourke et al 1995) o Hormona Luetinizante (LH) (Huanca et al 2001). La ovulación ocurre alrededor de las 30 horas después de la aplicación de GnRH, LH o por estímulo de monta (Ratto et al 2006, Huanca et al 2001).

Una primera etapa en el desarrollo de protocolos de Ovulación Múltiple y Transferencia de Embriones (MOET) involucra la superestimulación ovárica, con el propósito de inducir el crecimiento, maduración y ovulación de un gran número de folículos. Los protocolos de estimulación ovárica aplicados en camélidos incluyen el uso de Hormona Folículo Estimulante (FSH) o Gonadotropina Corionica Equina (eCG), durante una fase luteal inducida con la aplicación de Hormonas hipotalámicas (GnRH); fase luteal artificial con la aplicación de progestágenos exógenos y durante una fase de receptividad sexual (Bourke et. al 1992; Correa et al 1994). Las respuestas obtenidas son variables, alta incidencia de folículos luteinizados, baja tasa de recuperación embrionaria (0 - 2.3 embriones/ donadora) y de calidad variable (Del Campo M. et al 1995).

Los estudios orientados a la inhibición del desarrollo folicular con tratamientos con progesterona (Leyva

y Garcia 1999), señalan que ante la inserción de un progestageno intravaginal en llamas a cualquier momento del estadio folicular inhibe el crecimiento folicular y si al final del tratamiento se aplica 500 UI de eCG, se obtiene 5.2 ± 2.5 folículos y 2.1 ± 2.9 embriones recuperados (Chaves et al 2002). Similares resultados han sido reportados por otros autores. En alpacas, se realizó un estudio con la aplicación de un progestágeno intravaginal y la administración de 1000 UI de eCG, obteniéndose una alta respuesta ovárica con el número de Cuerpos lúteos (Velásquez y Novoa 1999). Estudios realizados por nuestro grupo de investigación sugieren que es factible obtener una adecuada respuesta ovárica en alpacas y llamas, cuando los animales son sometidos previamente a un protocolo de sincronización de onda folicular y el estímulo hormonal se inicia durante la emergencia de las ondas de crecimiento folicular, sustentado en el reporte de Ratto et al (2003).

Referente a la hormona a utilizar, se ha reportado un estudio para evaluar la respuesta de ambas hormonas, FSH y eCG, en llamas, habiéndose determinado que el número de folículos ≥ 6 mm sometidas a un protocolo de estimulación ovárica fue de 17.9 ± 2.2 al tratamiento con FSH y 17.7 ± 2.2 folículos con eCG (Ratto et al 2005). Estos resultados permitieron obtener evidencia que existe una buena respuesta ovárica a la acción de ambas hormonas, sin diferencias entre ambas. Alpacas y llamas sometidas a un protocolo hormonal de estimulación ovárica con eCG, iniciando el tratamiento durante la emergencia de las ondas de crecimiento folicular, permite obtener el desarrollo de 12.8 ± 1.4 folículos y 8.1 ± 1.0 cuerpos lúteo en llamas y 7.5 ± 1.2 folículos y 5.9 ± 1.3 cuerpos lúteo en alpacas (Huanca et al 2006)

La recuperación embrionaria puede ser realizada vía quirúrgica o no quirúrgica. El primer reporte sobre colección de embriones fue realizado de oviductos de alpaca, previa laparotomía (Novoa y Sumar, 1968) y la primera cría nacida por transferencia fue reportada por Sumar J. (1974). Posteriormente se reporta la colección de embriones mediante una técnica no quirúrgica a los 7 días en llamas y la transferencia en fresco con el nacimiento de una cría (Wiepz and Chapman 1985) Otros estudios confirman que la recuperación de embriones en estadio de blastocisto puede ser realizada a los 7 días pos servicio mediante técnicas no quirúrgicas en llamas y alpacas. La técnica de recuperación no quirúrgica utilizada en camélidos es similar a la reportada en vacunos, mediante la inclusión de una solución de Dulbecco PBS y los embriones recuperados observados y evaluados en un estereoscopio (Huanca et al 2004).

Resultados sobre recuperación y transferencia de embriones en llamas han sido descritos por Huanca

et al (2006) señalando la recuperación de 4.8 ± 0.9 embriones, con una tasa de recuperación 66,1 % del número posible de embriones, determinado en base al número de cuerpos lúteos. La tasa de preñez fue del 68.9%. En alpacas, se recuperaron 1.6 ± 0.3 , respuesta diferente de la observada en llamas, con una tasa de recuperación del 23.6 % de embriones posibles, con una tasa de preñez del 30.0 %. Igualmente, se ha reportado la recuperación de 37 embriones de 47 hembras no estimuladas (79 %), de las cuales resultaron en un 41 % de preñez al ser transferidas a receptoras (Taylor et al 2001).

La recuperación de las hembras donadoras fue evaluada, habiéndose observado una recuperación del tracto reproductivo, determinado por ecografía, a las 3 semanas posteriores al lavado uterino y una tasa de preñez luego de ser servidas, del 40 %, con un solo servicio (Huanca et al 2006). Esta observación permite plantear la posibilidad de realizar tratamientos de superestimulación y recuperación embrionaria al inicio de la época de empadre y luego de un descanso, realizar el servicio de las donadoras y obtener tasas de preñez similares a las observadas bajo condiciones de empadre continuo.

Estos resultados sugieren la posibilidad de obtener resultados satisfactorios con los protocolos de superestimulación ovárica en alpacas y llamas, permitiendo obtener embriones de buena calidad y viabilidad y que al ser transferidos permiten obtener tasas de preñez sobre el 50 %. Igualmente, la rápida recuperación de las hembras donadoras, permite señalar que una vez realizado el protocolo de estimulación hormonal, las hembras requieren un descanso aproximado de un mes, con tasas de preñez muy similares a las obtenidas bajo condiciones de crianza de los productores.

FERTILIZACION IN VITRO

La técnica de Fertilización In Vitro (FIV) se presenta como una de las tecnologías que mayor desarrollo esta experimentando en los últimos tiempos. La colección de ovocitos del folículo ovárico para la posterior maduración nuclear y citoplasmática, es la primera fase en el desarrollo de esta técnica (Miragaya et al 2006). En camélidos existe escasa información referida a la colección de ovocitos de ovarios de mataderos y madurados In Vitro. Un estudio realizado con ovocitos obtenidos de ovarios de matadero y madurados a 38°C y 5 % de CO_2 , en los que se utilizaron medios de maduración de uso en bovinos, reporta una alta tasa de ovocitos en MII (62 %) a las 32 horas de incubación (Del Campo et al 1992).

La obtención de ovocitos puede ser realizada de ovarios procedentes de mataderos o por aspiración transvaginal. En el primer caso, los mataderos no

siempre se encuentran cerca a los laboratorio, por lo que en una primera fase se evaluaron las diferencias en la calidad de ovocitos obtenidos de ovarios de alpacas y transportados desde el matadero, bajo dos diferentes temperaturas (4° y 35°C), los resultados sugieren una mejor calidad de los ovocitos procedentes de ovarios transportados a 35°C , respecto a los 4°C , (Huanca et al 2007). En el segundo caso, colección de ovocitos vía transvaginal, Brogliatti et al (2000) utilizando un transductor transvaginal de 7.5 MHz y aplicado vía transvaginal reporta la colección de 76 COCs de 134 folículos (57 %), mientras que la recuperación de ovocitos vía transvaginal en llamas, sometidas a estímulo hormonal permitió la recuperación de 10.7 ± 2.1 y 11.2 ± 2.3 COCs (71 y 74 %) (Ratto et al 2005). En alpacas, un ensayo preliminar señala la factibilidad de recuperar ovocitos vía transvaginal (Huanca et al 2006) y aún cuando se requieren mas investigación, estos resultados sugieren que es posible recuperar ovocitos vía transvaginal sin originar daños mayores en llamas y alpacas.

Miragaya et al (2002) estudio la maduración In Vitro de ovocitos, obtenidos por aspiración quirúrgica a las 22 horas después de la administración de un análogo de GnRH, en llamas estimuladas con un progestageno y estimuladas con 500 UI de eCG, obteniendo una maduración de 62 %, similar al reporte de Del Campo et al (1992). Estudios sobre Fertilización In Vitro señalan una tasa de desarrollo al estadio de pro núcleo del 29.2 y 57.1 % con dos diferentes dosis de heparina (2 y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), pero solo una tasa de desarrollo del 5.6 %, 6.0 % y 4.7 % para los estadios de morula, blastocisto temprano y blastocisto expandido, luego de 9 días de cultivo (Del Campo et al 1994).

Los resultados obtenidos señalan que el desarrollo de protocolos de FIV deberá ser una de las prioridades de investigación, en forma sistemática y conjuntamente con la Transferencia de embriones permitirán contribuir a diseñar alternativas tecnológicas para los programas de mejoramiento genético en los camélidos domésticos y en base a los resultados obtenidos, evaluar la posibilidad de su aplicación en camélidos no domésticos.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos a la fecha señalan que el desarrollo de la IA esta limitada al uso de semen fresco y se requiere estudios que permitan desarrollar protocolos orientados a obtener semen congelado, con resultados expresados en tasa de preñez similares a los obtenidos con semen fresco. En Transferencia de Embriones se han establecido protocolos de superovulación que permiten obtener un número alrededor de 5 embriones viables/ donadora y con una tasa de preñez mayor al 40 %. De otro lado, los estudios señalan que la recuperación de las hembras

donadoras se produce en un tiempo no mayor a los 40 días, permitiendo una tasa de preñez, al ser expuestas al macho, similar a las reportadas en las condiciones de campo. Los estudios iniciales sobre Fertilización In Vitro nos permiten sugerir lo promisorio de esta técnica y que contribuirá, conjuntamente con la transferencia de embriones, al progreso genético de los camélidos domésticos y como una primera fase para la aplicación de tecnologías reproductivas en los camélidos no domésticos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento por el financiamiento recibido del Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC), (Proyecto PROCOM 166 - 2006) y al Proyecto INCAGRO - Subproyecto FDSE Biotecnologías reproductivas 05-0015 - INCAGRO FDSE - UNMSM.

REFERENCIAS

- Adams GP, Sumar J., Ginther OJ. 1990. Effect of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas. *J. Reprod. Fertil.* 90: 535-545.
- Adams GP and Ratto MH 2001. Reproductive Biotechnology in south American camelids. *Rev Inv. Vet Perú. Suppl.* 1: 134 -141.
- Apaza N, Sapana R, Huanca T y Huanca W. 2001. Inseminación Artificial en alpacas con semen fresco en comunidades campesinas. *Rev. Invest. Vet. Perú. Suppl.* 1: 435 - 438.
- Bourke SA, Kyle CE, McEvoy TG, Young O, Adam CL. 1995. Superovulatory responses to eCG in llamas (*Lama glama*). *Theriogenology* 44, 255-268.
- Bourke D., Adam C. and Kyle C., Young P., and McEvoy TG. 1992. Ovulation, superovulation and embryo recovery in llamas. *Procc. 12th Congress Animal Reprod.* 1:193-195.
- Bravo W.; Sidkmore JA; Zhao X. 2000. Reproductive aspects and storage of semen camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 173-193.
- Bravo W, Flores U, Garnica J, Ordoñez C 1997. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology* 47: 619-626.
- Calderón W., Sumar J., Franco E. 1968. Avances en la Inseminación Artificial de la Alpaca (*Lama paco*). Vol 2. Lima - Perú, Facultad de Medicina Veterinaria - Universidad Nacional Mayor de San Marcos. pp 19 -25.
- Correa J., Ratto MH, and Gatica R. 1994. Actividad estral y respuesta ovárica en alpacas y llamas tratadas con progesterona y gonadotropinas. *Arch. Med. Vet.* 26:59-64.
- Chaves MG, Aba MA, Agüero A, Egey J, Berestin V, Rutter B. 2002. Ovarian follicular wave pattern and the effect of exogenous progesterone on follicular activity in non-mated llamas. *Anim. Reprod. Sci.* 69, 37-46.
- Del Campo MR, Donoso MX, Del Campo CH, Rojo R, Barros C, Parrish JJ, Mapletoft RJ 1992. In Vitro maturation of llama (*Lama glama*) oocytes IN: *Procc. 12th International Congress on Animal Reproduction.* Vol 1 pp 324-326.
- Del Campo MR, Del Campo CH, Donoso MX, Berland M, Mapletoft RJ. 1994. In vitro fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology.* 41(6):1219-29.
- Del Campo MR., Del Campo CH., Adams GP et al. 1995. The application of new reproductive technologies to south American camelids. *Theriogenology*, 43: 21 - 30.
- Fernández-Baca S. 1993. Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. *Anim Reprod. Sci.* 33:307-323.
- Fernández-Baca S. Y Calderón W. 1965. Métodos de colección de semen de la alpaca. *Rev. IVITA - Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.*
- Freyre G 2006. Experiencias de Transformación y Comercialización de la fibra de alpacas. Conferencia Internacional de Camélidos Sudamericanos. 30-31 de Marzo, Arequipa - Perú.
- Gomez C, Ratto MH, Berland M, Wolter M, Adams GP 2002. Superstimulatory response and oocyte collection in alpacas. *Theriogenology* 57, 584. Abst.
- Gaully M and Leindinger H. 1995. Semen quality characteristics, volume distribution and hypo-osmotic sensitivity of spermatozoa of *Lama glama* and *Lama guanicoe*. In Gerken M, Renieri C. Eds: *Procc. 2nd European Symposium on South American Camelids.* Università Degli Studi Di Camerino. Pp 235-244.
- Garnica J, Flores E, Bravo W. 1995. Citric Acid and Fructose concentration in seminal plasma of alpacas. *Small ruminants Res* 18: 95-98.
- Giuliano S., Director A., Gambarotta M, Trasorras V., Miragaya M. 2007. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*lama glama*). *Anim. Reprod. Sci.* Feb. 27.

- Huanca W, Cardenas O, Olazabal C, Ratto M, Adams GP 2001. Efecto hormonal y empadre sobre el intervalo a la ovulación en llamas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*. 1: 462-463.
- Huanca W., M.Ratto, A. Santiani, A, Cordero and T. Huanca. 2004. Embryo Transfer in camelids: Study of a reliable superovulatory treatment in llamas. 4th European Symposium on South American Camelids and DECAMA European Seminar, Gottingen, 7 - 9 October, 2004, Germany. Abstracts. Ed. M. Gerken, C. Renieri, M. Gaulty and A. Riek.
- Huanca W and Adams GP. 2007. Semen Collection and Artificial Insemination in Llamas and Alpacas. En: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, Youngquist R and Threlfall W. 2^o Edition Saunders. Elsevier Inc. pp 869-873.
- Huanca W. y Gaulty M. 2001. Conservación de semen refrigerado de llamas. *Rev. Inv. Vet. Perú Suppl* 1: 460-461.
- Huanca W, Ratto M, Vásquez M, Cervantes M, Cordero A, Huanca T and Adams GP. 2006. Fertilización In Vitro en camelids: Recuperación de ovocitos via transvaginal. Resumen XXIX Reunión Asociación Peruana de Producción Animal - Huancayo, Perú.
- Huanca W, Gonzalez M, Cordero A, Huanca T. 2006. Comportamiento reproductivo de donadoras de embriones, después de un protocolo de superovulación en llamas. Resumen V Congreso Mundial de Camélidos, Catamarca - Argentina.
- Huanca W, Ratto M, Cordero A, Santiani A, Huanca T, Cárdenas O, Adams GP. 2006. Respuesta ovárica y transferencia de embriones en alpacas y llamas en la zona altoandina del Perú. Resumen del V Congreso Mundial de Camélidos, Catamarca - Argentina.
- Huanca W, Palomino J, Cervantes M, Cordero A, Huanca T. 2007. Efecto de temperatura de transporte (35° y 4°C) sobre la calidad morfológica de ovocitos colectados desde ovarios de camal. Procc. XX Reunión ALPA y XXX Reunión APPA- Cusco, Perú.
- Leyva V. Y García W. 1999. Efecto de la progesterona exogena sobre la función del cuerpo lúteo de alpacas. Resumen del II Congreso Mundial de Camelidos-pp 87, Cuzco.
- Lichtenwalner AB, Woods GL, Weber JA, 1996. Ejaculatory patterns of llama during copulation . *Theriogenology* 46: 285-291.
- McEvoy TG, Kyle CE, Slater D. 1992. Collection, evaluation and cryopreservation of llama semen. *J. Reprod. Fert.* 9: 48 (Abstract)
- Miragaya M, Chaves MG, Capdevielle EF, Ferrer MS, Pinto MR, Rutter B., Neild DM. 2002. In Vitro maturation of llama (*Lama glama*) oocytes obtained surgically using follicle aspiration. *Theriogenology* 57 (1), 731.
- Miragaya M, Chavez MG, Agüero A. 2006. Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Ruminant Research* 61: 299-310.
- Mogrovejo D. Estudios del semen de la alpaca. 1952. BS Thesis, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú, 21 pp.
- Novoa C. Sumar J. 1968. Colección de huevos in vivo y ensayo de transferencia en alpacas. *Boletín extraordinario IVITA - UNMSM, Lima, Perú*, 3: 31 - 34.
- Novoa C., E. Franco; W. García; D. Pezo. 1999. Dosis de Gonadotropinas (eCG y hCG), superovulación y obtención de embriones en alpacas. *RIVEP. Perú* 10 (1):48-53.
- Pierson RA, Ginther OJ. 1984. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology* 21, 495-504.
- Pacheco C. 1996. Efecto de la tripsina y colagenasa sobre el acrosoma del espermatozoide y su relación con la fertilidad del semen de alpaca. 1996. Tesis MVZ Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú. 52 pp.
- Ratto M.H., Singh J., Huanca W., Adams G.P. 2003. Ovarian follicular wave synchronization and pregnancy rate after fixed-time natural mating in llamas. *Theriogenology* 60, 1645-1656.
- Ratto MH, Berland M, Huanca W, Singh j, Adams GP. 2005. In Vitro and In Vivo maturation of llama oocytes. *Theriogenology* 63, 2445 -2457.
- Ratto M, Huanca W, Singh J, Adams GP. 2006. Comparison of the effect of natural mating, LH and GnRH on interval to ovulation and luteal function in llamas. *Anim. Reprod. Sci.* 91 (3-4): 299-306.
- Raymundo F, Huanca W, Huertas S, Gaulty M. 2000. Influence of diferents extenders on the motility in alpaca (*Lama paco*) semen. Procc. 2nd International Camelids Conference on Agroecconomics of Camelids Farming. Almaty, Kazakstan, p 79 (Abstract)
- San Martín M, Copaira M, Zuñoga J., Rodríguez R., Bustinza G. Acosta L. 1968. Aspects of reproduction in the alpaca. *J. Reprod. Fertility* 16, 395-399.
- San Martín M. 1961. Fisiología de la reproducción de la alpaca, *Anim. Symp. Sobre problemas ganaderos*. Lima Peru, pp 121- 131.
- Sumar J y Leyva V. 1981. Colección de semen mediante

la vagina artificial en alpaca. Proceeding of the IVth International Conference on South America Camelids. Punta Arenas, Chile, 12 pp.

Sumar J. 2000. Llamas an Alpacas. IN: Reproduction in farm Animals. Seventh Edition. E.S.E. Hafez, B. Hafez

Sumar J. Y Franco E. 1974. Ensayos de Transferencia de Embriones en Camélidos Sudamericanos. IN: Informe Final (IVITA) UNMSM Lima, Perú.

Santiani A, Huanca W, Sapana R, Huanca T, Sepulveda N, Sánchez R. 2005. Effects of the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama paco*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian J. Androl.* 7(3) : 303-309.

Taylor S., Taylor PJ, James AN., Godke R. 2000. Successful commercial embryo transfer in the Llama (*Lama glama*). *Theriogenology.* 53, 1, 344.

Vaughan J.L. 2004. Artificial Breeding in alpacas. 4th European Symposium on South American Camelids and DECAMA European Seminar, Gottingen, 7 - 9 October, 2004, Germany. Abstracts. Ed. M. Gerken, C. Renieri, M. Gaulty and A. Riek.

Vaughan JL. 2001. Control of Follicular waves in alpacas. *Rev. Inv. Vet. Peru: Suplem.* 1:112 - 114. Lima - Perú.

WilsonWiepzd;ChapmanRJ.1985.Nonsurgical embryo transfer and live birth in a lama. *Theriogenology.* 24 (2) : 251 - 257.

Valdivia M,Ruiz M, Bermúdez L, Quinteros S, Gonzales A, Manosalva I, Ponce C, Olazábal J, Dávalos R. 1999. Criopreservacion de semen de alpacas. Resumen. II congreso Mundial sobre camelidos, Cusco, Peru 81abstract.