

Artículo de Revisión

ESTADO DE LA PRODUCCION DE EMBRIONES *in vitro* EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

State-of-the-art production of embryos *in vitro* in South American camelids

Jaime Ruiz Béjar

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.47>

Laboratorio de Biotecnologías
Reproductivas, Universidad Nacional
de Huancavelica, Perú.

E-mail: jaruizbejar@yahoo.es

RESUMEN

Los primeros trabajos de investigación en fecundación *in vitro* en camélidos sudamericanos se han realizado utilizando gametos recuperados de animales beneficiados. Estos trabajos han sido de valiosa ayuda para intentar estandarizar protocolos de maduración y fecundación *in vitro*. Sin embargo aún no se ha determinado el tiempo de maduración *in vitro* de ovocitos de alpacas y llamas, los últimos trabajos de investigación apuntan a que se requieren alrededor de 40 horas para obtener altas tasas de ovocitos en metafase II. Se han realizado diversos trabajos de fecundación *in vitro* de ovocitos de alpacas y llamas, aún no existe un protocolo definido que permitan obtener altas tasas de segmentación y blastocistos, sin embargo ya se han reportado gestaciones en alpacas y llamas y el nacimiento de una llama la primera cría por fecundación *in vitro*.

Palabras clave: *Embriones, fecundación in vitro, alpacas, llamas*

ABSTRACT

The first research on *in vitro* fertilization in camelids have been made using gametes of slaughtered animals recovered. This job has been of invaluable help to try to standardize protocols *in vitro* maturation and fertilization. However it has not yet determined the time of *in vitro* maturation of oocytes alpacas and llamas, recent research suggests that will require about 40 hours to obtain high rates of metaphase II oocytes. There have been several studies of *in vitro* fertilization of oocytes alpacas and llamas, there is still no defined protocol that will generate high rates of cleavage and blastocyst, however, pregnancies have been reported in llamas and alpacas and the birth of first breeding llama through IVF.

Keywords: *Embryos, in vitro fertilization, alpacas, llamas*

INTRODUCTION

La utilización de la fecundación *in vitro* (FIV) en camélidos sudamericanos podría ser una alternativa para el mejoramiento genético de camélidos domésticos y para la preservación de las especies silvestres. Sin embargo existen pocos reportes de FIV en camélidos sudamericanos (Del Campo *et al.*, 1994; Berland *et al.*, 2011; Mellisho *et al.*, 2014). Si bien la transferencia de embriones tradicional (embriones producidos *in vivo*) ha sido exitosa (Taylor, 2003; Huanca *et al.*, 2006a), produciendo cientos de crías de alpacas y llamas. Con la transferencia de embriones producidos por FIV se han reportado gestaciones tempranas en alpacas y llamas (Mendoza *et al.*, 2013; Trasorras *et al.*, 2014), y el reciente nacimiento de una llama en Huancavelica, nos indican que aún se necesitan mayores estudios que permitan estandarizar y optimizar protocolos de maduración *in vitro* (MIV) y FIV y así obtener mayores tasas de gestación y natalidad.

DISPONIBILIDAD DE COMPLEJOS OVOCITO-CÚMULO (COCS)

Ovarios de alpacas y llamas obtenidos de hembras beneficiadas en el matadero han sido una fuente importante para la recuperación de COCs, facilitando gran disponibilidad de ovocitos para la investigación en la estandarización de protocolos de MIV y FIV (Del Campo *et al.*, 1992; Mendoza *et al.*, 2008, Santayana *et al.*, 2012; Ayuque *et al.*, 2014). También se han recuperado COCs a través de laparotomía lateral en llamas (Miragaya *et al.*, 2002; Conde *et al.*, 2008); laparotomía ventral en vicuñas (Chaves *et al.*, 2003) y en alpacas (Ratto *et al.*, 2007; Gamarra *et al.*, 2007, Huanca *et al.*, 2010; Trasorras *et al.*, 2014), si bien estos autores lograron altas tasas de recuperación de COCs, la técnica resulta ser invasiva y útil solamente para aplicarla a manera de investigación, ya que es difícil en las donantes de ovocitos la repetición de las sesiones de recuperación de COCs.

El uso de la aspiración transvaginal guiada por ultrasonografía se presenta como una buena alternativa para recuperar COCs de llamas y alpacas, además podría facilitar la maximización del potencial genético de las hembras de estas especies, a través de la producción de embriones por FIV, ya que en forma natural las hembras de estas especies pueden tener 4 o 5 crías en toda su vida reproductiva. Sin embargo, existen pocos reportes del uso de esta técnica para la recuperación de COCs en llamas (Brogliatti *et al.*, 2000; Ratto *et al.*, 2005) y en alpacas (Huanca *et al.*, 2006b; Gamarra *et al.*, 2008), lo ausente en estas investigaciones es una evaluación sobre la competencia de desarrollo de los ovocitos en alpacas y llamas después de su fecundación *in vitro*. Sólo se han fecundado ovocitos de llama recuperados por aspiración transvaginal por ICSI (Sansinema *et al.*, 2007) y por FIV (Berland *et al.*, 2011), quedando pendiente la evaluación

del uso de ovocitos de alpacas recuperados por aspiración transvaginal para la FIV.

MADURACIÓN *in vitro*

Los COCs de llama fueron MIV por primera vez por Del Campo *et al.*, (1992), utilizando un tiempo de 36 horas en TCM-199 suplementado con suero fetal bovino, piruvato de Na, FSH, estradiol y sulfato de gentamicina, obtuvieron 62% de ovocitos que alcanzaron la metafase II (MII). En otro experimento, Del Campo *et al.*, (1994) obtuvieron 30% de ovocitos en MII luego de 30 horas de MIV. Distintos protocolos de recuperación de COCs se utilizaron en ambos experimentos, en el primer caso se aspiraron los folículos ováricos con ayuda de una jeringa mientras que en el segundo caso los ovarios fueron seccionados con ayuda de una hoja de afeitar recuperando una población muy heterogénea de ovocitos desde folículos preantrales y antrales en todos los estados de desarrollo. Por otro lado, Miragaya *et al.*, (2002) utilizaron 27-30 horas para MIV de COCs de llama utilizando un medio diferente a los casos anteriores, el cual estaba compuesto por TCM 199 con bicarbonato, 10% de suero fetal bovino y glutamina; obtuvieron 62% y 74% de ovocitos en MII recuperados sin tratamientos de superovulación y con superovulación respectivamente. En otro estudio, Ratto *et al.*, (2005) utilizando un medio de maduración similar al que usaron Del campo *et al.*, (1992, 1994), encontraron 77,7%, 80,6% y 80,4% de COCs en MII cuando utilizaron 28, 30 y 36 horas de MIV de COCs de llama sin diferencias estadísticas entre los 3 tiempos evaluados. Por otro lado, Sansinema *et al.*, (2003) para la MIV de COCs de llama introdujeron LH en su protocolo de maduración, así el medio de MIV estuvo compuesto por TCM-199, 5 µg/ml de FSH, 10 µg/ml de LH, 1 mg/ml de estradiol 17b y 10% de suero fetal bovino, y obtuvieron 52% de ovocitos en MII. Posteriormente Sansinema *et al.*, (2007) utilizó un medio diferente para la MIV consistente de TCM-199, 5 µg/ml de FSH, 10 µg/ml de LH, 10 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de IGF-1 y 1 µg/ml de estradiol 17b y 10% de suero fetal bovino, mejorando su anterior resultado con 74% de ovocitos en MII luego de 30 horas de MIV.

También se han madurado ovocitos de vicuña y alpaca. Chaves *et al.*, (2003), reportaron la única MIV de ovocitos de vicuña., utilizando 27 horas en un medio similar al utilizado por Miragaya *et al.*, (2002), obtuvieron 41% de maduración nuclear con extrusión del primer cuerpo polar y la totalidad de los ovocitos presentó maduración citoplasmática finalizado el tiempo de MIV. En alpacas, Ratto *et al.*, (2007) han utilizado 26 horas para la MIV de COCs de alpaca donantes superovuladas con FSH y eCG respectivamente. Alcanzando 82% y 64% de ovocitos en metafase II. Por otro lado, Ruiz y Correa (2007) maduraron ovocitos de alpaca y llama durante 27 y 30 horas respectivamente en TCM-199 suplementado con

piruvato de Na 0,2 mM, sulfato de gentamicina 50 µg/ml, FSH 0,02 unidades/ml, estradiol 17-β 1µg/ml y suero fetal bovino al 10%, obtuvieron 75% y 100% de ovocitos en MII de llama y alpaca respectivamente.

Con respecto al tiempo óptimo para la MIV, Ratto *et al.* (2005) indican que no existen diferencias significativas entre 28, 30 y 36 horas para la MIV de ovocitos de llama, sin embargo Ayuque *et al.*, (2014) encontraron que se requieren por lo menos 36 horas de MIV para la producción de embriones de llama producidos por FIV, en un estudio en el que evaluaron 30, 36 y 42 horas. Por otro lado, para la MIV de ovocitos de alpaca se han utilizado diferentes tiempos tales como: 24-26 horas (Ruiz *et al.*, 2007, Mendoza *et al.*, 2008, Huamán *et al.*, 2011) y 30 horas (Gamarra *et al.*, 2008). Sin embargo, Huanca *et al.* (2009) indican que son necesarias más de 38 horas para la maduración *in vitro* y Santayana *et al.* (2012) encontraron mayores tasas de ovocitos en metafase II y mayores tasas de segmentación, mórula y blastocistos con 32 horas, frente a 28 y 24 horas de MIV de ovocitos de alpacas. Estos resultados nos llevan a pensar que el tiempo óptimo de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca y llama aún no está definido.

FECUNDACIÓN *in vitro*

Del Campo *et al.*, (1994) utilizaron espermatozoides epididimarios de llama los cuales fueron usados para fecundar ovocitos de llama madurados *in vitro*, logrando por primera vez el desarrollo de embriones producidos por FIV en camélidos sudamericanos. En este trabajo obtuvieron 32% de división a los 2 días y a los 9 días 5,6% de mórulas, 6,0% blastocistos tempranos y/o expandidos y 4,7% de blastocistos eclosionados. En el año 2008 en Perú se realizaron los primeros reportes de FIV en alpacas (Gamarra *et al.*, 2008, Mendoza *et al.*, 2008). Gamarra *et al.*, (2008) utilizaron espermatozoides congelados de alpaca para fertilizar ovocitos madurados *in vitro*, obtuvieron 27,1% de división a las 72 horas, a los 5 días 8,0% de mórulas y blastocistos y a los 7 días de cultivo embrionario 3% de blastocistos eclosionados. Mendoza *et al.*, (2008) compararon los métodos de gradiente de Percoll y Swim up para la recuperación de espermatozoides epididimarios y utilizarlos en la FIV de ovocitos de alpaca. Obtuvieron 36,0% y 43,9% de división, 6,3% y 6,9% de blastocistos para Percoll y Swim up respectivamente.

En otros estudios, Conde *et al.*, (2006) utilizaron gametos recuperados de animales vivos, ya que es de esta manera en que la producción de embriones por FIV puede contribuir al mejoramiento genético si se utilizan gametos de animales de comprobada calidad genética. Los ovocitos se recuperaron por laparotomía lateral en hembras superovuladas y los espermatozoides fueron recuperados por electroeyaculación. El semen fue tratado

con colagenasa para reducir su viscosidad. Las tasas de división a las 48 horas post fecundación fueron 56% y 50% con y sin agentes capacitantes (heparina, penicilamina e hipotaurina). Asimismo Conde *et al.*, (2008) reportaron 40,8% y 42,2% de división a los dos días y 35% y 47% de blastocistos a los 8 días con y sin agentes capacitantes. Demostrando que la colagenasa no afecta la capacidad fecundante del semen y que es posible producir embriones de llama por FIV con semen fresco.

Gómez *et al.*, (2002) fecundaron ovocitos de alpaca con semen epididimario de llamas beneficiadas. Los 5 COCs que fueron fecundados y cultivados *in vitro* desarrollaron hasta mórula a los 6 días de evaluación, ninguno continuó el desarrollo hasta el estadio de blastocisto. Este es el primer reporte de la producción *in vitro* de embriones híbridos de alpaca-llama, experiencia que también fue reportada por Ratto *et al.*, (2007). Sin embargo, Del Campo *et al.*, (1995) indican que recuperaron ovocitos de alpacas superovuladas los cuales fueron fecundados con semen de llama y los embriones producidos desarrollaron hasta el estadio de blastocisto expandido. En Bolivia, Machicado *et al.*, (2009) recuperaron COCs por laparotomía en llamas superovuladas con eCG, los COCs fueron madurados *in vitro* en TCM-199 con BSA. Posteriormente, los ovocitos fueron inseminados con semen fresco tratado con proteasa. Obtuvieron 60% de ovocitos fertilizados. Al sexto día se obtuvo 29,4% de mórulas tempranas con un promedio de 8 blastómeros, 23,8% de mórulas con membrana irregular y 16 blastómeros, 29,4% de blastocistos tempranos provistos de zona pelúcida regular y delgada con numerosos blastómeros y 17,4% de blastocistos de forma circular, membrana regular con blastómeros difíciles de contar y sin espacios entre células.

En nuestro laboratorio, Huamán *et al.*, (2011) maduraron ovocitos de alpaca durante 25 horas y fueron fecundados con espermatozoides epididimarios recuperados por el método de Swin-up. Se compararon dos atmósferas de cultivo: 5% de CO₂ y 90% N₂, 5% CO₂ y 5% O₂, obteniendo como resultados para los embriones cultivados en atmósfera de cultivo con 5% de CO₂: 86,4%, 78,3% y 10,0% respectivamente, y para los embriones cultivados en 90% N₂, 5% CO₂ y 5% O₂: 91,3%; 86,1% y 11,2% para división, mórula y blastocistos respectivamente. En Chile, Berland *et al.*, (2011), recuperaron por primera vez COCs en llamas superovuladas con eCG y FSH. Los COCs expandidos colectados en ambos tratamientos fueron fecundados *in vitro* usando espermatozoides epididimarios. El porcentaje de división en el día 2 fue de 65,3 y 63,1%, mórulas en el día 5 46,2% y 42,5% y blastocistos en el día 7 fue de 23,1 y 20,5% no fue diferente (P>0.05) entre las llamas tratadas con FSH y eCG respectivamente. Concluyendo que los COCs expandidos recuperados por aspiración folicular transvaginal de llamas superovuladas con FSH o eCG pueden ser utilizados directamente para la FIV. Este es el

primer reporte de FIV con ovocitos recuperados por aspiración transvaginal.

Santayana *et al.*, (2012), maduraron ovocitos de alpaca por espacio de 24, 28 y 32 horas, obtuvieron mejor porcentaje de ovocitos en metafase II a las 32 horas, las tasas de división y blastocistos aumentaron gradualmente hacia el mayor tiempo de maduración, alcanzando a las 32 horas el mayor desarrollo embrionario con 60.2% y 17.0% para división y blastocistos respectivamente. Concluyendo que el tiempo óptimo para la maduración nuclear y la adquisición máxima de la capacidad de desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos de alpaca fue de 32 horas.

En llamas, Ayuque *et al.*, (2014) determinaron el tiempo óptimo de maduración nuclear de ovocitos en el desarrollo de embriones producidos por FIV, para ello MIV ovocitos de llama por espacio de 28, 36 y 42 horas. Los resultados obtenidos muestran que el mayor porcentaje de ovocitos en metafase II está entre 36 y 42 horas con 70,2% y 70,5 respectivamente, seguido de 28 horas con 49,1%. En cuanto a los resultados del desarrollo embrionario, obtuvieron porcentajes de segmentación, mórula y blastocistos de 51.0%, 71.5% y 11.6% respectivamente para 36 horas y los porcentajes de segmentación, mórula y blastocistos de 49.6%, 76.7% y 12.5% respectivamente para 42 horas. Concluyendo que el tiempo óptimo que requiere los ovocitos de llama para llegar a la madurez nuclear (metafase II) está entre 36 y 42 horas. Finalmente, Ramos *et al.*, (2015) evaluaron la capacidad fecundante de espermatozoides refrigerados en la FIV de ovocitos de alpacas. Se evaluaron muestras de espermatozoides refrigerados a 5°C por 0, 4 y 8 horas. Los resultados para división fueron: 48.0%, 45.1% y 45.6% para 0, 4 y 8 horas respectivamente; para mórula fueron: 67.7%, 55.8% y 52.9% para 0, 4 y 8 horas respectivamente; y para blastocistos fueron: 20.7%, 19.6% y 19.1% para 0, 4 y 8 horas respectivamente. En conclusión, a medida que aumenta el tiempo de refrigeración de los espermatozoides el porcentaje de producción de embriones por FIV disminuye.

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES FIV

Los primeros intentos de transferencia de embriones FIV han logrado gestaciones tempranas en alpacas (Mendoza *et al.*, 2013) y en llamas (Mendoza *et al.*, 2013, Trasorras *et al.*, 2014). Mendoza *et al.*, (2013) reportaron las primeras gestaciones en alpacas y llamas por FIV. Seleccionaron 3 alpacas y 5 llamas como receptoras, las cuales fueron sincronizadas con progestágenos intravaginales por 7 días y 5 días después del retiro de los mismos aplicaron GnRH para inducir ovulación previa detección ecográfica de un folículo dominante de 7 mm. La transferencia de embriones producidos *in vitro* se realizó 8 días después de la FIV. 45 días después se

comprobó ecográficamente que se obtuvo 1 alpaca (33%) y 3 llamas (60%) preñadas con embriones producidos por FIV. Trasorras *et al.*, (2014) fertilizaron ovocitos de llama recuperados por laparatomía 20 horas después de la inducción de la ovulación con 8 ug de buserelina. La inducción de la ovulación se hizo 5 días después del inicio del tratamiento superovulatorio con 1500 UI de eCG. Los ovocitos fueron fecundados con espermatozoides de llama recuperados por electroeyaculación. Las receptoras recibieron 8 ug de buserelina un día después de la cirugía de las donantes y la transferencia de embriones se realizó 6 días después de la aplicación de Buserelina. 23 días después de la transferencia de embriones se observó la preñez en una de las receptoras y a los 42 días se perdió la misma. En el año 2015, el laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica logró el nacimiento de una llama producida por FIV, utilizando un protocolo de FIV y de sincronización de receptoras similar al reportado por Mendoza *et al.*, (2013), se realizaron 15 transferencias de embriones, en esta oportunidad todas las receptoras fueron llamas. Se transfirieron 9 embriones de alpacas y 6 embriones de llamas producidos por FIV, se obtuvieron 6 gestaciones tempranas, de las cuales sólo 4 continuaron su desarrollo y 3 fueron abortadas entre los 7 y 10 meses de gestación, y solamente una llama logró terminar la gestación satisfactoriamente, produciéndose el primer nacimiento del Mundo de una cría FIV de camélidos sudamericanos.

CONCLUSIONES

Si bien se ha demostrado que es factible producir embriones en camélidos sudamericanos por FIV, son necesarios mayores estudios sobre los medios de cultivo para MIV y FIV que permitan optimizar el desarrollo embrionario en estas especies. Por otro lado es necesario guiar las investigaciones para producir embriones *in vitro* recuperando gametos de machos y hembras vivas lo cual sería un gran aporte para el mejoramiento genético. Asimismo son necesarios estudios para el uso de semen eyaculado de alpaca o llama colectado por vagina artificial, que es otro gran reto a vencer debido a la dificultad del manejo del semen por la filancia del semen. Finalmente falta mucho por investigar para lograr estandarizar protocolos de maduración y fecundación *in vitro*, así como de la sincronización de las receptoras para lograr mayores tasas de preñez y natalidad.

REFERENCIAS

- Ayuque A, Justiniano E, Mendoza J, Landeo L, Ruiz J. Efecto del tiempo de maduración *in vitro* en la capacidad meiótica y desarrollo de embriones de llama. *Spermova* 2014; 4(1): 99 – 101.
- Berland M, Von Baer A, Ruiz J, Parraguez V, Ratto M. *In vitro* fertilization and development of cumulus

- oocytes complexes collected by ultrasound-guided follicle aspiration in superstimulated llamas. *Theriogenology*. 2011, 75: 1482–1488.
- Brogliatti GM, Palasz AT, Rodriguez-Martinez H, Mapletoft RJ, Adams GP. Transvaginal collection and ultrastructure of llama (*Lama glama*) oocytes. *Theriogenology* 2000 54: 1269-1279.
 - Chaves M, Miragaya M, Capdevielle E, Rutter B, Guliano S, Agüero A. Maduración *in vitro* de oocitos de vicuña obtenidos por aspiración quirúrgica de folículos de ovarios superestimulados. III Congreso Asociación Latinoamericana de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. Alepycs. 2003. Viña del Mar – Chile.
 - Conde PA, Herrera C, Trasorras VL, Giuliano S, Directo, A, Miragaya MH, Chaves MG, Carchi MI, Stivale D, Quintans C, Agüero A, Rutter B, Pasqualini S. *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Animal Reproduction Science*. 2008 109: 298 – 308.
 - Conde P, C Herrera, MG Chaves, SM Giuliano, A Director, VL Trasorras, M Pinto, MI Carchi, D Stivale, B Rutter, A Agüero, MH Miragaya, RS Pasqualini. *In vitro* production of llama embryos by IVF or ICSI. *Reproduct, Fertil and Develop*. 2006 19 (1): 237 – 238.
 - Del Campo MR, Del Campo CH, Adams GP, Mapletoft RJ. The application of new reproductive technologies to South American Camelids. *Theriogenology* 1995 43: 21-30.
 - Del Campo M. Del Campo C, Donoso M, Berland M, R Mapletoft. *In vitro* fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology* 1994 41: 1219-1229.
 - Del Campo MR, MX Donoso, CH Del Campo *et al.* *In vitro* maturation of Llama (*Lama glama*) oocytes. *Proc 12th Int Cong Anim Reprod*, 1992; vol 1, p 324.
 - Gamarra G, Huamán E, León S, Carpio M, Alvarado E, Asparrin M, Vivanco W. First *in vitro* embryo production in alpacas (*Lama pacos*). *Reproduction, Fertility and Development*, 2008; 21: 177-178.
 - Gamarra, G., Gallegos, A., Alvarado, E., Asparrin, M. and Vivanco, W. 2007. Techniques for ovum pick-up in gonadotropintreated alpacas. *Reproduction, Fertility and Development* 20, 159–160.
 - Gómez C, Ratto MH, Berland M, Wolter M, Adams GP. Superstimulatory response and oocyte collection in Alpacas. *Theriogenology* 2002 57: 584 (Abstract).
 - Huanca W, Condori R, Chileno M, Cainzos J, Becerra J, Quintela L, Herradon PG. *In vivo* maturation and *in vitro* fertilization of alpaca oocytes. *Reproduction, Fertility and Development* 2010 23(1): 204–205.
 - Huanca W, Condori R, Cainzos J, Chileno M, Quintela L, Becerra J, Herradon PG. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of alpaca (*Vicugna pacos*) oocytes: effect of time of incubation on nuclear maturation and cleavage. *Reproduction, Fertility and Development* 2009; 22(1): 327–327.
 - Huanca W, Ratto M, Cordero A, Santiani A, Huanca T, Cárdenas O, Adams, G. Respuesta ovárica y transferencia de embriones en llamas y alpacas en la zona altoandina del Perú. *Memorias del IV Congreso Mundial de Camélidos*. 2006a. Catamarca-Argentina.
 - Huanca W, Ratto M, Vásquez M, Cervantes M, Cordero A, Enciso M, Huanca T, Adams G. Fertilización *In Vitro* En Camélidos, I: Recuperación de ovocitos vía transvaginal. *Memorias de la XXIX Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal*. Universidad Nacional del Centro del Perú. 2006b. Huancayo. Perú.
 - Huamán E, Ticllacuri F, Landeo L, Ruiz J. Efecto de la atmósfera de cultivo sobre el desarrollo de embriones de alpacas producidos por fecundación *in vitro*. XXXIV Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. 2011. Trujillo – Perú.
 - Machicado R, Delgado PA, Flores. Descripción del proceso de fertilización *in vitro* de ovocitos de llama (*Lama glama*) obtenidos por superestimulación ovárica con eCG y fertilizados con semen tratado con proteasa. V Congreso Mundial sobre Camélidos. 2009. Riobamba, Ecuador.
 - Miragaya, M.H., Chaves, M.G., Capdevielle E.F., Ferrer, M.S.; Pinto, M., Rutter, B., Neild D.M., Agüero A. *In vitro* maturation of llama (*Lama glama*) oocytes obtained surgically using follicle aspiration. *Theriogenology*. 2002 57 (1): 731.
 - Mellisho E, Rivas V, Ruiz J, Mamani, G. Effect of sperm selection on the rate of *in vitro* fertilization in alpaca (*vicugna pacos*). *Reproduction, Fertility and Development* 2014 27(1) 217-218.
 - Mendoza J, Landeo L, Yauri M, Manrique L, Molina R, Castañeda F, Contreras J, Ruiz J. Experiencias preliminares de gestación en alpacas y llamas con transferencia de embriones de alpacas producidos *in vitro*. XXXVI Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. 2013. Lima – Perú.
 - Mendoza J, Ayuque A, Triviño F, Ayuque G, Landeo L, Ruiz J. Evaluación de dos métodos de recuperación de espermatozoides epididimarios para la fecundación *in vitro* de ovocitos de alpaca. XXXI Reunión Científica de la Asociación Peruana de Producción Animal. 2008. Lima – Perú.
 - Ramos M, Martínez E, Mendoza J, Landeo L, Ruiz J. Capacidad fecundante de espermatozoides refrigerados en la producción *in vitro* de embriones de alpacas (*Vicugna pacos*) Huacaya. VII Congreso Mundial de Camélidos. 2015. Puno. Perú.
 - Ratto M, C Gómez, M Berland, G Adams. 2007. Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas *Animal Reproduction Science* 97: 246-256.

- Ratto M, Berland M, Huanca W, Singh J, Adams G. *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes. *Theriogenology* 2005; 63: 2445-2457.
- Ruiz JA, Correa JE, Ayuque G, Landeo L, Yaranga M, Zacarías A. Producción *in vitro* de embriones partenogenéticos de alpaca y llama. I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Universidad Nacional de Huancavelica. 2007. Perú.
- Ruiz JA, JE Correa. Maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca y llama aspirados vía laparoscópica. I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. 2007. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú.
- Sansinema M, Taylor S, Taylor P, Schmidt E, Denniston R, Godke R. *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Animal Reproduction Science*. 2007 99: 342-353.
- Sansinema M, Taylor S, Taylor P, Denniston R, Godke R. Production of Nuclear Transfer Llama (*Lama glama*) Embryos From *in vitro* matured llama oocytes. *Cloning Stem cells* 2003.5: 191-198.
- Santayana P, Mendoza J, Landeo L, Mujica F, Ruiz J. Tiempo de maduración de ovocitos de alpaca en el desarrollo embrionario por fecundación *in vitro*. VI Congreso Mundial de Camélidos. 2012. Arica. Chile.
- Taylor, P. Practical embryo transfer in the South American camelids. III Congreso Mundial sobre Camélidos. 2003. Potosí-Bolivia.
- Trasorras V, Castex CB, Alonso A, Giuliano S, Cruz RS, Arraztoa C, Chaves G, Rodríguez D, Neild D, Miragaya M. First llama (*Lama glama*) pregnancy obtained after *in vitro* fertilization and *in vitro* culture of gametes from live animals. *Animal Reproduction Science*, 2014, 148, (1-2): 83-89.