

APLICACIÓN DE TECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS EN EL PERÚ, SU IMPACTO EN EL DESARROLLO GANADERO, RETOS POR ENFRENTAR

The use of reproductive Technologies in Peru, its impact in the livestock industry development, challenges to confront

Henry William Vivanco Mackie^{1,2}

¹ Universidad Nacional Agraria
La Molina, Lima, Perú.

² VIVANCO INTERNATIONAL
SAC. Lima, Perú.

* Corresponding author

Henry Vivanco

E-mail:

williamvivanco@vivancoint.com

ABSTRACT

The use of reproductive technologies in the reproduction of the domestic animals has different objectives, between the most important uses are the prevention of diseases transmitted via natural mating, the optimization of the reproductive management, the more economic interchange of genetic material, the development of more efficient animal production systems, the generation of offspring with predetermined sex and genetic composition according to market requirements, the conservation of genetic resources and the increment of the rate of genetic gain in the animal populations; being this last application the one that has the most frequent and important usage and the most significant impact in the animal production industry. The importance of the reproductive technologies in animal improvement is because it allows us to achieve a significant increment in the reproductive rate of selected individuals (to get the maximum number of offspring per breeding animal), this makes possible to obtain high intensity and precision of selection and at the earliest age possible (reducing generation interval) resulting in the highest genetic gain per unit of time. From all the reproductive technologies developed, the artificial insemination (AI) in cattle is the most widely used technology globally and at national level in Peru, followed by the embryo transfer (ET) in cattle and by the AI and ET in sheep. From the design and usage of the in vitro embryo production and methodologies for the embryo micromanipulation it has started the development of a series of advanced reproductive technologies from a simple embryo bisection up to cloning of individuals, reproduction using stem cells and production of quimeras with cells genetically modified. In Peru is only in the last decade that the research and development and commercial application of reproductive technologies in the livestock reproduction has started with some advances in in vitro embryo production, embryo transfer, animal cloning, etc. with visible impact in the animal production industry and generating many challenges in order to increase its efficiencies and achieve its commercial use.

Keywords: reproductive technologies, animal genetic improvement

RESUMEN

La utilización de tecnologías reproductivas en la reproducción de los animales domésticos tiene varios objetivos, entre los más importantes tenemos la prevención de enfermedades transmisibles vía reproductiva, la optimización del manejo reproductivo, el intercambio económico de material genético, la creación de nuevos y más eficientes sistemas de producción, la generación de crías de sexo y composición genética pre-determinada de acuerdo a las necesidades del mercado, la conservación de los recursos zoogenéticos y el incremento de la tasa de progreso genético en las poblaciones animales; siendo ésta última la aplicación que tiene mayor uso y mayor impacto en la producción animal. La base fundamental del efecto de las tecnologías reproductivas en el mejoramiento genético animal es que nos permiten lograr el incremento de la tasa reproductiva de animales selectos (obtener el máximo número posible de crías por reproductor) lo que permite a su vez una mayor intensidad y precisión de selección y a la más temprana edad posible (reduciendo intervalo generacional) lográndose el máximo progreso genético por unidad

de tiempo. De todas las tecnologías reproductivas desarrolladas, la inseminación artificial (IA) del ganado bovino es la tecnología reproductiva más aplicada tanto a nivel mundial así como en el Perú seguida por la transferencia embrionaria (TE) en vacunos y la IA y TE en ovinos. A partir del diseño y uso de la producción embrionaria *in vitro* y de metodologías de micromanipulación embrionaria se han desarrollado una serie de tecnologías reproductivas avanzadas que van desde la simple bisección embrionaria hasta la clonación de individuos, la reproducción en base a células madre y la reproducción de quimeras con células embrionarias resultantes de células somáticas editadas genéticamente. En el Perú es sólo en esta última década en que se viene trabajando tanto en investigación y desarrollo tecnológico como en la aplicación comercial de tecnologías reproductivas avanzadas tales como la producción de embriones *in vitro*, transferencia embrionaria, clonación, etc. con impactos palpables en la producción animal así como también con retos muy grandes para lograr su optimización y uso comercial.

Palabras clave: tecnologías reproductivas, mejoramiento genético

INTRODUCCION

La tecnología reproductiva de mayor difusión e importancia a nivel mundial, así como en el Perú es la inseminación artificial, fundamentalmente debido al bajo costo y alta efectividad de su aplicación en la mayoría de las especies domésticas. Existen hoy en día muchas otras tecnologías reproductivas que se desarrollan a medida en que se avanzan los conocimientos de la fisiología reproductiva y de la genética animal y las capacidades para el diseño y construcción de instrumentos más precisos y versátiles. Entre las principales tecnologías reproductivas en uso y/o en desarrollo podemos identificar a:

- La Monta natural controlada y dirigida
- La colección, procesamiento y conservación seminal (a temperatura ambiente, refrigerado, congelado) e Inseminación artificial
- El control y sincronización del ciclo ovárico y estral
- La inmunización para incremento de tasa ovulatoria
- La superovulación, producción embrionaria *in vivo*, su colección y transferencia a receptoras.
- La colección de ovocitos, maduración, fertilización “*in vitro*”, el cultivo “*in vitro*” de embriones y su transferencia
- La reproducción juvenil pre-puberal (JIVET).
- La conservación/ criopreservación de ovocitos y embriones.
- El sexado de embriones
- El sexado de semen
- La liofilización del semen
- La micro manipulación de embriones para biopsia, bisección, reconstrucción embrionaria, ICSI,
- La clonación de embriones por transferencia nuclear
- El cultivo y reprogramación de células somáticas y Clonación de individuos por transferencia nuclear
- La producción de Quimeras
- El uso de células madre o eternas “Stem Cells” en la reproducción.

Si bien todas las tecnologías reproductivas enlistadas tienen un importante rol en la reproducción y mejora genética animal, algunas de ellas marcan todo un hito ya que han revolucionado las formas de reproducir los animales generando las bases para nuevas tecnologías más avanzadas, así, la colección de ovocitos, su maduración y fecundación *in vitro*, el cultivo *in vitro* de los embriones resultantes y su transferencia, constituyen el avance más significativo desde la invención de la inseminación artificial por Lázaro Spallanzani en el año 1776 (citado por

Pérez y Pérez, 1985). La tecnología embrionaria *in vitro* es la base para la generación de otras tecnologías más avanzadas y permite la maximización de la producción de crías por unidad de tiempo de las hembras reproductoras pasando en vacunos por ejemplo de una cría por vaca año hasta 100 crías por vaca año (Vivanco-Mackie, 2000; Smeaton y Vivanco, 2001); el advenimiento del uso comercial del semen sexado permite que dicha incrementada producción de crías sea de sexo pre determinado (Arlotto, et al., 1996). Otro hito fundamental lo constituye la criopreservación de gametos y embriones que permite el intercambio genético dentro y fuera de países, regiones y continentes y posibilita la conservación de germoplasma a largo plazo (Polge et al., 1949; Willadsen et al., 1974).

El uso de la laparoscopia para la inseminación artificial de semen congelado en ovinos (Vivanco et al., 1985) resuelve las limitaciones anatómicas para la IA con semen congelado en dicha especie y como consecuencia se establece el comercio internacional de semen ovino. Sobre la base de la producción embrionaria *in vitro* y la disponibilidad de equipos que facilitan la micromanipulación de gametos y embriones (micromanipuladores) se han construido nuevas tecnologías reproductivas de gran potencial tales como la clonación embrionaria por bisección (Vivanco y Greaney, 1992) y la inseminación intracitoplasmática o “ICSI” (García-Roselló et al., 2009) pero no es sino hasta el desarrollo de la reprogramación celular y la clonación por transferencia nuclear (Wilmut et al., 1997, 1997a; Wells et al., 1999; Vivanco-Mackie, 2000) que se logra un nuevo impacto, una nueva forma de reproducción (asexual) que permite apuntalar programas de modificación genética, rescatar razas/especies en extinción (Wells et al., 1999), multiplicar animales especiales, hacer quimeras con células editadas por CRISPR, etc.; éstas tecnologías y la utilización de células madre en la reproducción (Zhao et al., 2009) así como la exitosa producción de crías con semen liofilizado (Choi et al., 2011), constituyen la frontera actual más avanzada. En este artículo trataremos de ver cómo se ha avanzado en el Perú en el desarrollo y/o uso de las diversas tecnologías reproductivas y cuáles son los principales retos por enfrentar para lograr el uso de éstas en la mejora de las poblaciones de ganado del Perú.

Desarrollo y/o uso de tecnologías reproductivas en el Perú.

1. Inseminación artificial.

La aplicación de la IA en bovinos en el Perú se inició en el año 1945 como un servicio en convenio entre la Asociación de Ganaderos del Perú y la entonces Escuela Nacional de Agricultura, hoy Universidad Nacional Agraria La Molina

(UNALM) iniciándose con pruebas experimentales usando el dilutor Yema-Fosfato y conservando el semen a 4°C. A partir de 1950, el servicio se hace extensivo al campo variándose la fórmula del dilutor a Yema-Citrato, (ver revisión de Cunliffe, 1990). En 1977, se introduce en la Central de IA de la UNALM por William Vivanco un cambio que facilitó mucho la congelación, el "Dilutor Tris", el cual permite realizar la adición del dilutor glicerinado a medio ambiente, eliminando el trabajo de la cámara fría (ver Flores et al., 1982); desde esos inicios hasta la fecha la UNALM ha tenido un rol activo en el desarrollo de la IA en bovinos en el Perú manejando servicios de producción de semen y capacitación en inseminación artificial; en el área de investigación y desarrollo tecnológico se hicieron investigaciones de tipo aplicado, siendo mayormente comparativos de diversos dilutores y tasas de congelamiento y su evaluación a través tanto de los parámetros seminales como de la tasa de preñez obtenida (Duarte y Rodríguez, 1964; Pacheco, 1964; Vivanco y Delgado, 1980; Chinpén, 1980; Vivanco y Espinoza, 1974; Vivanco y Valdivia, 1974), posteriores estudios determinan el impacto genético de la IA, comparan dilutores comerciales y la eficiencia reproductiva en establos que usan la IA (Cunliffe, 1990; Mellisho, 1997; Cabrera y Pantoja, 2012; Suárez, 2015; Salinas, 2016). El total de dosis de semen usadas anualmente para la inseminación del ganado bovino en el Perú se ha incrementado grandemente desde sus comienzos hasta la fecha debido mayormente al uso intensivo del semen congelado importado por los establos lecheros de la costa, pero aún sigue siendo muy reducida la población de vacas inseminadas en relación al total de vacas de la población nacional (se insemina menos del 5%). En promedio por año en los últimos 8 años se usan en el Perú 260 mil dosis de semen congelado importado de bovino lechero y 10 mil dosis de bovinos para carne, siendo la oferta de semen congelado nacional en promedio de 90 mil dosis anuales casi en su totalidad de toros de razas lecheras (Salinas, 2016). Un estimado, ya que no hay estadísticas al respecto, es que alrededor del 10% de las dosis importadas de semen congelado de bovinos lecheros es semen sexado el cual es usado principalmente en vaquillas de primer servicio.

El mayor reto para la IA con semen congelado de bovino en el Perú es cómo lograr tasas de preñez satisfactorias en los establos de ganado lechero con vacas de alta producción en sistemas intensivos; evaluaciones no publicadas del autor en establos de la costa peruana muestran más de 3 servicios por preñez, lo cual es abismalmente bajo en comparación a las tasas que se obtenían tres décadas atrás (1.5 a 1.8 servicios por preñez), requiriéndose de estudios que identifiquen las causas determinantes de esta baja fertilidad y planteen alternativas de solución.

La IA en ovinos en el Perú se inició alrededor del mismo tiempo en que se inició la IA en vacunos. En 1943, el Dr. Mackenzie, realizó las primeras inseminaciones en ganado ovino en el Perú en la hacienda LAIVE en Junín (ver revisión de Suárez, 2015), a partir de entonces se difunde su uso rápidamente; las décadas de los años 1950 y 1960 las define Calle Rigoberto (1968) como la etapa del uso intensivo de la inseminación artificial de ovinos en el Perú donde el Banco de Fomento Agropecuario ejerció una labor de promoción fundamental con más de cien mil inseminaciones anuales sumadas a las inseminaciones de las grandes empresas ganaderas lo que totalizaban más de 300 mil inseminaciones anuales; las inseminaciones se efectuaron por vía cervical superficial con semen puro o diluido con dilutor yema-citrato y aplicado ya sea inmediatamente después de la dilución o refrigerado a 4°C. Esta tecnología de IA cervical superficial con semen puro o diluido en yema-citrato se mantuvo como el único método de

IA en ovinos a nivel mundial hasta el desarrollo de sistemas de congelamiento de semen de carnero con el dilutor TRIS por Salamon y Visser (1972) en Australia y el método de inseminación intrauterina laparoscópica por Vivanco y colaboradores a inicios de la década de los 80, inseminando semen congelado importado de Australia en forma de pellets y congelado en dilutor TRIS a 500 ovejas Corriedale en la SAIS Pachacutec, Junín, obteniendo más de 800 corderos nacidos (Vivanco et al., 1985); este avance constituye un hito fundamental para el desarrollo de la industria de la congelación de semen ovino y su comercialización a nivel mundial.

A partir del éxito en la IA laparoscópica con semen congelado, se empiezan trabajos de optimización de la producción de semen congelado ovino en el Perú (Vivanco y Valera, 1980; Vivanco y Alarcón, 1987) pero que se detienen por más de una década debido a factores que afectaron la estructura de tenencia de la tierra y la paz y seguridad en las praderas altoandinas así como debido a falta de políticas de promoción de la producción ovina. En los últimos 10 años sin embargo se reinicia el interés en el mejoramiento genético ovino y se efectúan trabajos de investigación aplicada para optimizar la congelación del semen ovino y reducir los daños estructurales del proceso de congelación (Quispe, 1998; Sandoval, 2005; Ruiz et al., 2007; Cabrera y Pantoja, 2008; Cabrera et al., 2010; Perez, 2011; Delgado, 2013; Vargas, 2015; Apaza, 2017; Castro et al., 2017). No existen estadísticas peruanas sobre el uso actual de la inseminación con semen fresco y congelado de ovinos, nosotros (VIVANCO INTERNATIONAL SAC) venimos efectuando la reconversión genética del ganado ovino en el Perú para obtener poblaciones especializadas en la producción de lana fina, en la producción de corderos de beneficio temprano y en la producción de leche ovina, a través de programas de IA y TE financiados por fondos concursables del estado así como fondos privados, habiendo efectuado en el periodo 2007-2018 un total de 2,100 inseminaciones por vía laparoscópica con semen congelado importado, 500 inseminaciones con semen fresco por vía laparoscópica, 1,143 inseminaciones con semen fresco por vía cervical y 12,000 inseminaciones por vía laparoscópica con semen congelado por nosotros en el país, consiguiendo en promedio 68% de preñez para el semen congelado importado, 58% para inseminación cervical fresco, 75% para inseminación laparoscópica fresco y 65% para inseminación laparoscópica con semen congelado nacional.

A nivel mundial continúan los esfuerzos por lograr una técnica de inseminación transcervical en el ovino que permita la inseminación de semen congelado sin necesidad de laparoscopia sin que se haya aún logrado una técnica del todo exitosa y repetible. En una investigación inicial nosotros (Vivanco y Alarcón, 1987) obtuvimos fertilidad satisfactoria con IA con semen congelado inseminado por vía cervical, esta investigación no fue continuada, pero amerita reiniciarla.

Para lograr una mayor difusión de la IA en ovinos en el Perú es necesario por un lado la capacitación de los productores en producción de dosis de semen fresco para inseminación cervical y la instalación y consolidación de núcleos genéticos élite (NGE) con animales de alto valor genético certificado de las razas de interés que produzcan principalmente reproductores que al ser distribuidos a las comunidades campesinas y pequeños productores éstos sepan utilizarlos vía inseminación cervical con semen fresco. La producción de semen congelado por los NGE sería necesaria sólo para efectos de banco de germoplasma y uso estratégico.

La IA en caprinos: especie en la que es factible hacer la IA con semen congelado por vía intracervical y donde el uso de la IA a nivel internacional es intenso. A nivel nacional se han hecho muy pocos trabajos de IA en caprinos (Vivanco et al., 1982; Palomino et al., 2001; Tapia et al.; 2011). El uso comercial de la IA en caprinos en Perú es limitado, pero hay importaciones esporádicas de semen de nuevas líneas genéticas y se espera que a medida que la explotación caprina se consolide más se ampliará el uso de la IA en esta especie; algunas granjas tecnificadas de caprinos vienen ya colectando semen en granja y efectuando sus inseminaciones.

La IA de cerdos en el Perú se inicia con los trabajos pioneros realizados en la UNALM en la colección, dilución, congelamiento del semen e inseminación artificial de marranas (Vivanco y Díaz, 1974; Vivanco y Su Che, 1975; Vivanco y Vergara, 1980) trabajos que sirvieron de base para el desarrollo de la IA en cerdos y que se reiniciaron luego de varios años con aportes de otros investigadores e instituciones (Carpio et al., 2008; Bellido y Blanco, 2013; Julca, 2014). Hoy en día la IA en porcinos es usada comercialmente en el Perú ya sea con semen importado o con semen colectado en granja utilizando genética especializada de alto nivel, no se disponen de estadísticas de su uso; es utilizada sólo en las granjas intensivas de alta tecnificación. A medida que los productores se entrenen en el uso de la IA en cerdos se espera un aumento en su uso comercial; no existen limitaciones tecnológicas sustanciales.

La IA en equinos en Perú se inicia en la UNALM, desarrollando dilutores y métodos de conservación del semen e IA en caballos peruanos de paso (Vivanco y Zapata, 1980., Vivanco et al., 1988), después de estos inicios las investigaciones no se continúan por varios años y sólo recientemente se han realizado algunas investigaciones para optimizar refrigeración y congelamiento de semen equino en el Perú (Rodríguez, 2007; Olmos et al., 2013; Orozco et al., 2011; Gallo et al., 2013). Sin embargo, el uso comercial de la IA en equinos se ha expandido bastante en los criaderos de caballos de paso que son atendidos por profesionales especializados; el comercio de semen congelado es aún muy incipiente en el Perú y los resultados de fertilidad de este son aún muy variables requiriéndose mayor investigación tanto básica como aplicada.

La inseminación artificial de camélidos sudamericanos en el Perú se viene desarrollando desde hace más de 50 años (Mogrovejo, 1952; Fernández Baca y Calderón, 1966; Fernández Baca y Novoa, 1968), estos esfuerzos muchas veces aislados y discontinuados lograron progreso muy lento y a pesar de que en los últimos 20 años se ha logrado más sustancial avance (Cárdenas et al., 1987; Pérez, 1997; Bravo, et al., 1997; 1999 y 2000; Bravo, 2001; Vivanco et al., 2008) existen aún problemas fundamentales por resolver y que son vinculados a la muy peculiar fisiología reproductiva de los camélidos y en particular a su fisiología seminal. Se han diseñado y ensayado diversos métodos de colección seminal (Mogrovejo, 1952; Fernández Baca y Calderón, 1966; Fernández Baca y Novoa, 1968; Johnson, 1989; Sumar y Leyva, 1981; Sumar, 1985; Cárdenas et al., 1987; Bravo et al., 1997; Gauli, 2000; Bravo, 2001; Vivanco et al.; 2008), así como estrategias para para obviar la dificultad de manejar un eyaculado denso y viscoso (Bravo et al., 1996b; Bravo et al., 1997b; Pacheco, 1996; Bravo et al., 2000). Los datos sobre evaluación de parámetros seminales de camélidos sudamericanos son relativamente escasos, los promedios son bastante diferentes entre los diferentes informes y no existen estudios que correlacionen parámetros seminales con fertilidad. Esta es un área que requiere investigación de

manera que se pueda optimizar la fertilidad tanto de la monta natural como de la inseminación artificial, la fertilización de donantes de superovulación y la fecundación in vitro.

Comparativamente con otros rumiantes tales como los bovinos, ovinos, caprinos (Bearden y Fuquay, 1980; Vivanco, 1998) y aun en comparación al camello dromedario (Musa et al., 1992) o el bactriano (Mosaferi et al., 2005), la disponibilidad de espermatozoides motiles y normales por eyaculado o colecta en los camélidos sudamericanos es muy baja; es por ello muy necesario el mejoramiento de este parámetro fundamental para la aplicación práctica y costo efectiva de la inseminación artificial mediante selección genética para incremento de tamaño testicular y nivel adecuado de testosterona en los machos, se debe así mismo optimizar la nutrición para garantizar un desarrollo testicular adecuado.

Los primeros trabajos de inseminación artificial en camélidos sudamericanos han sido hechos con semen sin diluir (Calderón et al., 1968; Fernández Baca y Novoa, 1968; Leyva et al. 1977), posteriormente se empieza a trabajar con dilución para inseminación con semen fresco y refrigerado (Pacheco, 1996; De la Vega, 1996; Bravo et al., 1997b; Pérez et al. 2004, Vivanco et al., 2014). En cuanto a conservación de semen por congelamiento, se han hecho algunos trabajos con resultados variables en su fertilidad post inseminación (Bravo et al., 1996; Pérez et al., 2004), nuestros trabajos (Vivanco et al., 2014; 2014b) consiguen el congelamiento seminal manteniendo una satisfactoria tasa de sobrevivencia embrionaria post congelamiento en el dilutor TRIS-Yema- Fructosa que en promedio produce 6.1 dosis por cada eyaculado con un promedio de 14.2 millones de espermatozoides motiles por pajuela post descongelamiento. Los resultados de preñez hasta el nacimiento varían de acuerdo a la cantidad de espermatozoides motiles por dosis presentes al descongelamiento requiriéndose de 24 a 30 millones de espermatozoides motiles por dosis para lograr 40% de tasa de nacimientos (Vivanco et al., 2015).

La inducción de ovulación en alpacas o llamas destinadas a inseminación artificial se ha efectuado ya sea mediante inyección de hCG (alrededor de 750 UI) o GnRH (alrededor de 80 µg) o mediante copulación con macho vasectomizado tanto en hembras sujetas a inspección ovárica para determinación de estado de desarrollo folicular o simplemente exponiendo las hembras al macho para determinar receptividad; se puede decir que prácticamente la inducción de ovulación para IA en alpacas no es una limitante (ver revisión de Bravo et al., 2000).

Un aspecto no estudiado con el suficiente detenimiento es la frecuencia de colección en alpacas que permita una producción sostenida de dosis de inseminación y la influencia de las estaciones o meses del año en la producción seminal. Nosotros hemos observado el rápido agotamiento de alpacas macho sometidos a una colección diaria durante la estación reproductiva reduciéndose prácticamente a cero la presencia de espermatozoides en el eyaculado después de 7 días de colección, igualmente Bravo et al. (1997), en machos alpaca colectados tres veces por día interdiario al décimo día producían sólo plasma seminal habiendo agotado totalmente su reserva espermática.

Siendo que los machos alpaca producen muy poco volumen seminal de muy baja concentración y agotan su reserva espermática rápidamente, es necesario estudiar métodos alternativos de inseminación artificial que permitan el máximo ahorro espermático de tal manera que se usen menos células espermáticas motiles por inseminación y se puedan inseminar

más hembras por eyaculado, en ese sentido hemos ensayado (Vivanco et al., 2014) la inseminación intrauterina laparoscópica en comparación a la inseminación intrauterina vía cervical depositando el semen en el cuerno ipsilateral al folículo dominante. La tasa de preñez en promedio fue de 40% de preñez con ≥ 20 millones de espermatozoides móviles/dosis, sin que hayan diferencias significativas entre los métodos de IA; las inseminaciones se efectuaron 29 h después de la inducción y con sedación de la receptora tanto para IA laparoscópica como para la intracervical. Bravo et al. (1997), tampoco encontraron diferencias en tasa de preñez entre inseminación laparoscópica y cervical cuando las dosis de inseminación fueron semen puro sin diluir y de una concentración de 147 millones de espermatozoides por mililitro.

En base a la información disponible podemos concluir que la inseminación artificial en camélidos sudamericanos es aún una técnica en desarrollo con resultados inconsistentes, pero que si bien es cierto que se debe incrementar sustancialmente la eficiencia actual de la inseminación artificial en camélidos sudamericanos, la tecnología en su estado actual de desarrollo permite ya su uso en programas de mejora genética ya que aumenta moderadamente (de un eyaculado se obtienen en promedio 6 dosis de inseminación) la tasa reproductiva de los machos.

Las mayores limitantes en el desarrollo y aplicación comercial de la IA en alpacas es la baja concentración y bajo volumen del eyaculado y el rápido agotamiento de sus reservas espermáticas, la mucosidad del semen que dificulta su manejo y dilución/conservación y su aparente exigencia de alta concentración por dosis de inseminación artificial lo que determina una muy baja cantidad de dosis de inseminación logradas por eyaculado por macho por temporada reproductiva. Por lo que se debe poner énfasis en resolver estos cuellos de botella para lograr una metodología de IA que dé resultados previsible y sea costo efectivo.

La IA en cuyes, el cuy (*cavia porcellus*) es una especie utilizada en el Perú como fuente proteica y por lo tanto existen granjas de producción intensiva y tecnificada de esta especie en las que hay interés en utilizar la IA como instrumento de mejora genética; no se ha logrado aún desarrollar todo el paquete tecnológico. El primer trabajo que hicimos en la UNALM fue desarrollar un método exitoso de colección seminal por electro eyaculación (Vivanco et al., 1978), lamentablemente este trabajo tampoco ha sido continuado en el Perú, más bien en Ecuador se ha hecho una investigación reciente sobre colección y criopreservación del semen del cuy (Mise, 2014). Es un área que necesita seguirse desarrollando en el Perú.

2. Producción y transferencia de embriones.

Se conoce como transferencia embrionaria a todo el proceso desde la producción de los embriones utilizando material genético de “donantes” (machos y hembras) hasta la transferencia de los embriones resultantes al aparato reproductor de las “recipientes” para su anidación, gestación, nacimiento y amamantamiento.

La producción de los embriones puede hacerse en dos formas:

a) Dentro del aparato reproductor de la hembra “donante”, a este método se le conoce como producción embrionaria in vivo y a todo el proceso de producción embrionaria in vivo usando estrategias superovulatorias y la subsecuente

transferencia de los embriones producidos se le conoce como MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer).

b) En laboratorio, obteniendo los gametos (semen y ovocitos) de los animales donantes y efectuando la maduración de dichos gametos, la fertilización de los ovocitos y la incubación de los embriones resultantes en forma controlada en el laboratorio, a este método se le conoce como producción embrionaria in vitro o IVP (in vitro Embryo Production). El procedimiento para la transferencia embrionaria propiamente dicha a la receptora es igual tanto para el sistema MOET como para IVP.

a) Producción y transferencia de embriones in vivo.

La producción de embriones in vivo en vacunos y su transferencia aún no ha alcanzado en el Perú una aplicación comercial sostenida, se han hecho esfuerzos para su difusión principalmente por Gobiernos Regionales que han instalado sendos laboratorios para ese fin pero que no han prosperado. En cuanto a investigación se han hecho algunos trabajos experimentales de tipo aplicado para medir la eficiencia de la tecnología en su aplicación en granja (Rengifo et al., 2011; Díaz et al., 2012; Osorio, 2013; Pereyra, 2014; Medrano et al., 2014; Marca y Aracayo, 2017). Comercialmente existen algunos profesionales que brindan servicios de producción embrionaria in vivo y su transferencia en granja, pero no se dispone de datos estadísticos sobre la cantidad de embriones producidos y colectados anualmente, se estima un promedio de 500 transferencias anuales para los últimos 5 años. El Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) produjo en el año 2013 (Osorio, 2013) 1,500 embriones de las razas Holstein y Brown Swiss que fueron transferidos en sus programas de extensión agraria en diversas regiones del país y que constituyen a la fecha la mayor producción embrionaria in vivo en vacunos en el Perú. Actualmente el Ministerio de Agricultura y Riego viene produciendo embriones in vivo en la Estación Experimental Agraria “DONOSO” del INIA en Huaral, Perú, de las razas Brahaman, Gir; Fleckvieh y Braunvieh con fines de promoción agropecuaria. La mayor limitación para la difusión de la producción embrionaria in vivo en vacunos es la gran variabilidad en las respuestas ovulatorias y consecuentemente en el número de embriones colectados por “ronda” de superovulación; actualmente se vienen conduciendo trabajos experimentales en el Perú para validar los resultados publicados en el extranjero sobre el uso de los niveles de Hormona Anti Mulleriana (AMH) en el plasma sanguíneo de las vacas como indicativo de su habilidad para responder a la superovulación (Monniaux et al., 2008; 2010); esto posibilitará efectuar la selección de donantes y reducir la variabilidad en respuestas lo cual favorecerá la adopción de la TE por parte de los ganaderos.

La producción de embriones in vivo en ovinos y su transferencia en el Perú ha cobrado gran importancia recién en los últimos 10 años.

La técnica de colección embrionaria más usada en ovinos universalmente es la exteriorización del cuerno uterino por laparotomía ventral de la donante y el lavado a través de la cateterización del cuerno uterino (Vivanco-Mackie, 2001; Gibbons y Cueto, 2013); fue necesario este tipo de cirugía debido a la imposibilidad de introducir un catéter transcervicalmente para hacer el lavado “no quirúrgico” como se hace en otras especies de rumiantes (vacunos, caprinos,

alpacas); una alternativa desarrollada inicialmente por Mc Kelvey et al. (1986) es la colección embrionaria por lavado uterino vía laparoscópica en que no es necesaria la exteriorización del tracto reproductivo, nosotros usamos la técnica de Mc Kelvey en Nueva Zelanda pero debido a que esta técnica implicaba la inyección del medio de lavado ya sea a nivel de oviducto o unión útero tubárica utilizando un "áspic" o aguja, resultó en detrimento de la futura fertilidad de las donantes por daños a nivel de esas regiones anatómicas (Vivanco et al., 1994) lo que nos indujo a modificar la técnica laparoscópica obteniendo una técnica en que no es necesaria la inyección del medio usando áspics o agujas sino que el medio se introduce a través del catéter Foley y se practica un "sifoneo" con una jeringa hipodérmica que inocular el medio; esta modificación solucionó los problemas de fertilidad mencionados, esta técnica la hemos usado ya por varios años (Vivanco-Mackie, 2001; Stockebrand, 2003).

En el Perú la gran mayoría de los trabajos de investigación y de aplicación comercial de la producción y transferencia embrionaria in vivo en ovinos ha sido conducida por VIVANCO INTERNATIONAL SAC como instrumento de reconversión genética ovina (Vivanco, 2013; 2013b), existen otros esfuerzos (Estación experimental INIA en Puno y Huancayo; Universidad Daniel Alcides Carrión, Pasco) pero no se disponen de publicaciones científicas de referencia sobre sus resultados. Desde el inicio de las actividades de reconversión genética ovina en el Perú por Vivanco International en el año 2007 a la fecha, se han transferido en el Perú alrededor de 1,500 embriones congelados importados y 200 embriones frescos producidos en el Perú; las tasas de preñez en promedio son 48% para embriones congelados importados y 65% para los embriones frescos.

Producción y transferencia de embriones in vivo en equinos, caprinos y cerdos en el Perú es muy reducida tanto a nivel de investigación y de aplicación comercial; en equinos se usa en la reproducción en criaderos de caballos de paso y en cerdos y caprinos para la introducción de líneas de genética importada, pero no se disponen de estadísticas ni de publicaciones al respecto.

Producción y transferencia de embriones in vivo en alpacas es un área de gran interés en el Perú y se vienen realizando investigaciones para perfeccionar protocolos de superovulación, sistemas de colección embrionaria y su transferencia. En los camélidos sudamericanos además de las ventajas de la TE comunes a todas las especies, se tiene la ventaja adicional de que la tecnología de transferencia embrionaria permite la reproducción de animales puros de una especie gestados en otra especie (transferencia inter especies) lo cual podría permitir el rescate y multiplicación de especies silvestres como vicuñas y guanacos gestados en llamas o alpacas; así Taylor et al. (2001) transfiriendo embriones de alpacas puras a llamas produjo crías alpaca normales que fueron aceptadas por las nodrizas y el rebaño de llamas al cual pertenecieron las recipientes; ese experimento fue también validado por nosotros (Vivanco et al., 2014) así como otros grupos de investigadores en el Perú (Huanca et al., 2012; Pacheco et al., 2016). En los primeros ensayos de superovulación en alpacas (Novoa y Sumar, 1968; Correa et al., 1992, 1994; Novoa et al., 1999) se usaron diversas estrategias superovulatorias con resultados muy variables en términos del número de embriones transferibles por donante sometida a tratamiento superovulatorio, sin lograr que esta tecnología sea aplicable comercialmente pero después de varios años de trabajo en el desarrollo de regímenes superovulatorios, métodos de colección y transferencia embrionaria, tenemos hoy en día una tecnología repetible y

comercialmente eficiente para la producción y transferencia embrionaria in vivo en alpacas (Vivanco et al. 2014; 2015c, Vivanco et al., 2009; Vivanco, 2013; Vivanco-Mackie et al., 2015b) con un promedio de 4 embriones transferibles por alpaca por ronda de superovulación y 40% de nacimientos para embriones frescos. Nuestros trabajos de congelamiento y vitrificación de embriones si bien nos producen embriones con parámetros satisfactorios de desarrollo y gestaciones, éstas, sin embargo, se pierden alrededor del día 110 de gestación (Vivanco-Mackie et al., 2015b) por lo que aún seguimos trabajando intensamente para lograr este objetivo. Otros grupos de investigadores tienen similares rendimientos con embriones en fresco (Carnero et al., 2011; Huanca et al., 2012; Huanca et al., 2014; Pineda et al., 2012; Sumar et al., 2012) pero aún no hay reportes de nacimientos de embriones congelados.

b) Producción y transferencia de embriones in vitro.

La tecnología de colección de ovocitos y producción de embriones "in vitro" (OPU-IVP), se viene desarrollando hace más de 3 décadas a nivel mundial para las diversas especies domésticas no solamente como una alternativa para evitar los problemas (tales como limitado número de embriones producidos por donante y gran variabilidad en las respuestas superovulatorias, alto costo, etc.) que se tienen en la ovulación múltiple y producción de embriones "in vivo" (MOET), sino que tiene sus virtudes específicas y permite aplicaciones imposibles de lograr con la técnica de MOET. Esta tecnología permite potencialmente obtener material genético de hembras de diferente edad (juveniles pre o post púberes, adultos y hasta seniles) y diferentes estados fisiológicos (lactantes, secas, vacías, preñadas, ciclando normalmente, inducidas a ciclar durante el anestro) y de animales muertos (ya sea beneficiados, muertos por accidente o sacrificados por razones humanitarias).

El potencial de la tecnología de OPU-IVP de revolucionar la industria animal es enorme ya que su aplicación permitirá incrementar aún más las tasas de progreso genético (se puede reducir el intervalo generacional en forma dramática) y la creación de nuevos y más eficientes sistemas de producción (mellizaje por transferencia embrionaria, producción de compuestos genéticos o híbridos, producción de animales para carne en rebaños/hatos de lecheras, etc.).

En el Perú hemos (VIVANCO INTERNATIONAL SAC) trabajado intensamente para introducir y desarrollar la tecnología de OPU-IVP, primero a través del diseño e instalación del CIETE (Centro de Investigación y Extensión en Transferencia Embrionaria) en el año 2,000, para el convenio entre la UNALM y el Ministerio de Agricultura; luego mediante la instalación de SEMBRYO, el primer laboratorio comercial para la aplicación de tecnologías reproductivas en Virú, Trujillo, para la Compañía LACTEA SA en el año 2014 y a través de consultorías a las principales universidades y difusión técnica a nivel nacional. Actualmente se cuenta con laboratorios de investigación en tecnologías reproductivas avanzadas en varias universidades del país (Univ. Toribio Rodríguez de Mendoza en Amazonas, Univ. Nacional de Huancavelica; Univ. Mayor de San Marcos de Lima; Univ. Nacional de Altiplano; Univ. Daniel Alcides Carrión de Pasco; Univ. San Cristóbal de Huamanga y otras) así como en las Estaciones Experimentales del INIA en Ayacucho, Puno, Huancayo y San Martín y nuevos emprendimientos comerciales con el uso de producción embrionaria in vitro tales como el laboratorio VICTORIA de Vitor, Arequipa. Podemos decir que ya se inició la producción

de embriones in vitro en el Perú, con uso comercial en bovinos (el Perú es el segundo país en América Latina en número de colecciones de ovocitos y producción de embriones in vitro en Vacunos con más de 6,500 sesiones de colección de ovocitos y 10 mil embriones in vitro producidos en SEMBRYO el año 2016; IETS 2016) y en investigación tanto en bovinos como alpacas.

El primer ternero nacido de embrión in vitro se generó en el CIETE en el año 2008 así como los primeros embriones in vitro de alpacas producidos a nivel mundial (Gamarrá et al; 2009), trabajo que fue luego continuado por otros laboratorios de universidades nacionales, culminando con el nacimiento de una llama generada de embrión in vitro mediante transferencia interespecie en llama (Ruiz, 2015).

Nosotros (en trabajo inicial efectuado en el año 2000 e informado en Vivanco et al., 2014) ensayamos colección transvaginal de ovocitos en llamas y alpacas vivas usando el transductor de 5/7.5 MHz y guía de aguja Modelo Meva (Pie Medical®, Holanda) conectado al ultrasonógrafo Parus 240 (Pie Medical® Holanda) y con el sistema de aspiración folicular, por lo que tenemos desarrolladas las técnicas para colección de ovocitos de animales vivos en camélidos; muchos de los trabajos hechos en universidades trabajan con ovocitos colectados de ovarios de matadero.

El desarrollo de la producción de embriones in vitro en las otras especies ganaderas (ovinos, caprinos, equinos, etc.) aún no se ha iniciado en el Perú.

3. Las tecnologías reproductivas avanzadas.

Sobre la base de una tecnología de producción de embriones in vitro se han desarrollado una serie de tecnologías avanzadas tales como la bisección embrionaria, la biopsia embrionaria para sexaje y genotificación, la inseminación Intracitoplasmática de ovocitos (ICSI), la clonación de embriones y la clonación de individuos y recientemente la producción de quimeras con células editadas por CRISPR; estas tecnologías vienen siendo aplicadas en diversas partes del mundo; en Perú hemos venido trabajando con bisección embrionaria en SEMBRYO habiendo producido ya terneros gemelos idénticos mediante esta tecnología tanto de razas cebuinas como de la Holstein, también la Universidad Toribio Rodríguez de Mendoza ha informado sobre el nacimiento de gemelos idénticos usando bisección embrionaria, la misma universidad informó del nacimiento de un ternero nacido de clonación de un animal adulto por transferencia nuclear (por la metodología de "Hand Made Cloning" y SEMBRYO ha producido un clon de una vaca adulta por transferencia nuclear de células de granulosa ovárica usando la misma tecnología que usamos en Nueva Zelanda al clonar un vacuno por primera vez a nivel mundial (Wells et al., 1999). SEMBRYO viene trabajando también en ICSI en vacunos, pero no se ha informado aún de nacimiento de terneros producto de ICSI aunque se han producido un buen número de embriones.

CONCLUSIONES

Las tecnologías reproductivas son uno de los instrumentos más poderosos disponibles para la mejora animal, conservación de recursos genéticos, optimización de la salud animal y de los sistemas productivos usados en la producción animal. En el Perú, en los últimos 10 años han incrementado sustancialmente los esfuerzos tanto estatales como privados en la investigación, desarrollo tecnológico y aplicación comercial de tecnologías

reproductivas en la producción animal con resultados palpables. La continuidad de estos esfuerzos debe ser incentivada.

REFERENCIAS

- Apaza L. Efecto protector de yema de huevo en la viabilidad de semen congelado de carnero. Tesis Médico Veterinario y Zootecnista. Universidad Nacional del Altiplano, Puno. 2017. 140p.
- Arlotto T, Beaumont S, Vivanco HW. Bovine in vitro fertilization with low numbers of flow cytometrically sorted sperm. Proceed. 13 Int. Congress on Animal Reproduction. Sydney Aust. 1996. Vol 3. P 8-2.
- Bearden HJ, Fuquay J. Applied Animal Reproduction. Reston Publishing Co. Reston Virginia. 1980.
- Bellido E, Blanco HA. Efecto de dos dilutores sobre la preservación de semen de verraco. Tesis Ing. Zootecnista Univ. Nacional de Huancavelica. 2013.
- Bravo Oscar F. Estudio Comparativo de tres métodos de colección de semen de alpacas. Tesis Ing. Zootecnista. Univ. Nac. Agraria La Molina. Lima Perú. 2001.
- Bravo PW, Skidmore JA, Zhao XX. Reproductive aspects and storage of semen in camelidae. Animal Reprod. Science. 2000; 62: 173-193
- Bravo PW, Pacheco C, Quispe G, Vilcapaza J, Ordoñez C. Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. Archives of Andrology. 1999; 43 (3): 239-246
- Bravo PW, Solís P, Ordoñez C, Alarcón V. Fertility of male alpaca: effect of daily consecutive breeding. Animal Reprod Science. 1997; 46: 305-312.
- Bravo PW, Enríquez E, Ordoñez C. The effect of trypsin and three extenders on alpaca semen. Allpack's, 1997b; 6:9-21
- Bravo PW, Moscoso J, Ordoñez C, Alarcón V. Transport of spermatozoa and ova in female alpaca. Animal Reprod. Science, 1996; 43: 173-179.
- Bravo PW, Ordoñez C, Alarcón V. Processing and freezing of semen of alpacas and llamas. 13th Int. Cong. In Anim. Rep. Sydney Abast: 1996b; 2-3.
- Cabrera P, Pantoja C. Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. Rev Inv Vet Perú. 2012; 23(2): 192-200.
- Cabrera P, Orellana J, Pantoja C. Efecto de dos dilutores sobre la motilidad e integridad de la membrana espermática en semen congelado de ovinos. Rev. Investig. Vet. 2010; 21(2): 154 - 160.
- Cabrera P, Pantoja C. Influencia de los dilutores tris y ovine freezing sobre la integridad de la membrana citoplasmática durante la congelación de semen de ovinos en pajillas de 0.5 ml. Rev Inv Vet Perú. 2008; 19(2):152-159.
- Calderón W, Sumar J, Franco E. Avances de la inseminación artificial de alpacas (*Lama pacos*). Rev. Fac. Med. Vet., Lima 1968; 22:19-35.
- Calle ER. Producción de Ovinos. Publicaciones del Departamento de Producción Animal de la Universidad nacional Agraria La Molina. Lima Perú, 1968. 203 pags.
- Cárdenas H, Vivanco W, Bravo F. Comparativo de dos métodos de colección de semen de alpacas. Resúmenes X Reunión Científica Anual. Asociación Peruana de Producción Animal. Puno Perú. 1987.
- Carnero S, Huanca W, Cordero A, Vásquez M, Huanca T. Transferencia embrionaria ipsilateral y contralateral a la

- posición del cuerpo lúteo y supervivencia embrionaria en llamas. *Rev Inv Vet Peru*. 2011; 22: 114-120.
- Carpio CM, Cadillo CJ, Mellisho SE. Efecto de dos métodos de congelación sobre la viabilidad espermática de semen de verraco. Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima. *Rev Inv Vet Perú* 2008; 19 (1): 15-19
 - Castro J, Chirinos D, Orellana J. Calidad del Semen Refrigerado de Carneros Assaf y Blackbelly. *Rev Inv Vet Perú*. 2017; 28(3): 764-770.
 - Chimpen J. Estudio comparativo de la fertilidad del semen congelado nacional e importado en doce establos de la cuenca lechera de Lima. Tesis Ing. Zootecnista. UNALM, Lima, Perú. 1980.
 - Choi YH, Varner DD, Love CC, Hartman DL, Hinrichs K. Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in horse. *Reproduction*. 2011; 142:529-538.
 - Correa JE, Ratto MH, Gatica R. Actividad estral y respuesta ovárica en alpacas y llamas tratadas con progesterona y gonadotrofinas. *Arch. Med. Vet.* 1994; 26: 59-64.
 - Correa JE, Gatica R, Ratto M, Ladrix R, Schuler C. Studies on nonsurgical recovery of embryos from South American camelids. In: *Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction*, vol. 2, The Hague, 23-27 August, 1992. pp. 788-790.
 - Cunliffe SD. Análisis de la producción y distribución del semen nacional. Su uso e impacto entre 1982-1986. Tesis Ing. Zootecnista. UNALM Lima, Peru. 1990.
 - De La Vega D. Efecto de la concentración espermática y la hora de inseminación artificial con semen fresco sobre el porcentaje de gestación en alpacas. Tesis Médico Veterinario-Zootecnista. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Altiplano, Puno, Peru. 1996. 54pp.
 - Delgado B. Evaluación espermática de semen de ovino tratado por la técnica de gradiente de densidad. Tesis Licenciada en Biología. Universidad Ricardo Palma, Lima. 2013. 98p.
 - Díaz R, Rengifo O, Almeyda J. Técnica de multiovulación y transferencia de embriones de ganado bovino en condiciones de trópico del Perú. *AgroInnova*. 2012;13: 18-23.
 - Duarte C, Rodríguez C. Estudio comparativo entre los dilutores Leche Homogeneizada y citrato - yema sobre la congelación y fertilidad del semen del toro. Tesis Ing. Zootec. U.N.A. La Molina, Lima - Perú. 1964.
 - Fernández-Baca S, Novoa C. Primer ensayo de inseminación artificial (*Lama pacos*) con semen de vicuña (*Vicugna vicugna*). *Rev. Fac. Med. Vet.*, Lima 1968. 22:9.
 - Fernández-Baca S, Calderón WV. Método de colección de semen de la alpaca. *Rev. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor de San Marcos*, Lima, Perú. 1966. 18-21.
 - Flores MA, Pallete A, Vivanco W, Chavez CJ, Vaccaro R, Almeyda J, Calderón J, Cárdenas H. Banco Nacional de Semen. *Notas Ganaderas*. Año 7 N° Junio. PMA-UNALM. 1982.
 - Gallo S, Vargas S, Orozco V, Evangelista S, Santiani A. 2013. criopreservación de semen de caballo peruano de paso utilizando dimetilacetamida como agente crioprotector *SPERMOVA* 2013; 3(1): 71 - 72.
 - García-Roselló E, García-Menqual E, Coy P, Alfonso J, Silvestre MA. Intracytoplasmic sperm injection in livestock species: an update. *Reprod. Domestic Anim.* 2009, 44 (1): 143-151.
 - Gauly M. Reproduction in male South American camelids. Semen collection, semen preservation and artificial insemination. *Alpacas Beyond 2000. International Alpaca Conference proceedings*. Christchurch, New Zealand. September 2000.pp 1-10.
 - Gibbons A, Cueto M. Manual de Transferencia de embriones en ovinos y caprinos. Segunda Edición. INTA. EEA Bariloche. Centro Regional Patagonia Norte. 2013. 44pp
 - Huanca T, Gonzáles M, Mamani-Cato RH, Cárdenas O, Sapana R, Naveros M. Evaluación de la recuperación de embriones en alpacas y llamas donadoras simples y superestimuladas. En: *Mem XXXVII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal*. Abancay: APPA. 2014. p 252-2
 - Huanca T, Mamani RH, Cárdenas O, Gonzáles ML, Sapana R. 2012. Evaluación del peso al nacimiento, destete, al año de edad y curva de crecimiento de alpacas y llamas cría nacidas por transferencia de embriones interespecies. *SpermoVA*; 2(1): 44-46.
 - IETS 2016. Statistics and Data Retrieval Committee Report. The year 2016 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. IETS. USA.
 - Julca AE. Conservación de semen porcino en refrigeración usando el dilutor con agua de coco (*Cocus nucifera* L.), en Tingo María. Tesis Ing. Zootecnista Univ. Agraria de la Selva. Tingo María, Perú. 2014.
 - Jonson LW. Llama reproducción. In: *Jonson LW Editors, Llama Medicine*. Vet. Clin. North American Food Animal Practitioners WB Saunders, Philadelphia. 1989
 - Leyva V, Franco E, Sumar J. Inseminación artificial en camélidos sudamericanos. *Mem. Primera Reunión Científica Anual de La Asoc. Peruana de Producción Animal*. 1977. 32-39. Lima, Peru.
 - Marca DH, Aracayo P. Eficiencia de tres protocolos de superovulación y transferencia de embriones a tiempo fijo en vacas brown swiss PPC del CIP ILLPA – FCA UNA PUNO. Tesis Ing. Agrónomo, Mención Zootecnia. Universidad de Puno Perú. 2017.
 - Mc Kelvey WAC, Robinson JJ, Aitken RP, Robertson IS. Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. *Theriogenology*. 1986; 25: 855-865.
 - Medrano RJ, Evangelista SV, Sandoval MR, Ruiz L, Delgado AC, Santiani A. aplicación de la técnica no quirúrgica de transferencia de embriones bovinos en un establo de la cuenca lechera de Lima. *Revista de Investigaciones veterinarias en el Perú*. 2014; 25:1.
 - Mellisho E. Parámetros reproductivos en vacas lecheras de tres establos de la Cuenca de Lima. Tesis Ing. Zootecnista UNALM-Lima. 1997. Pp. 138.
 - Mise MN. Evaluación de la críoconservación del semen de Cobayo (*Cavia porcellus*). Tesis Médico Veterinario. Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Universidad Técnica de Cotopaxi, Ecuador. 2014.
 - Mogrovejo D. Estudios del semen de la alpaca. 1952. Tesis Médico veterinario. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor de S. Marcos. Lima Perú, 1952
 - Monniaux D, di Clemente N, Touzé JL, Belville C, Rico C, Bontoux M, Picard JY, Fabre S. Intrafollicular steroids and anti - Müllerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biol. Reprod.* 2008. 79, 387-396.
 - Monniaux D, Barbey S, Rico C, Fabre S, Gallard Y, Larroque H. Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle?. *REprod. Fertil. Dev.* 2010; 22:1083-1091.
 - Mosaferi S, Niasari-Naslaji A, Abarghani A, Gharahdaghi AA, Gerami A. 2005. Biophysical and biochemical characteristics of Bactrian camel collected by artificial vagina. *Theriogenology* 63 (1): 92-101.

- Musa B, Sieme H, Merkt H, Hago BED. Artificial insemination in dromedary camels. In: Proceedings of the First International Camel Conference. 1992. p:179-182.
- Novoa C, Sumar J. Colección de huevos in vivo y ensayo de transferencia en alpaca. En: Boletín Extraordinario IVITA. Univ. Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. 1968. p: 31-34.
- Novoa C, Franco E, García W, Pezo D. Dosis de gonadotropinas (eCG Y hCG), superovulación y obtención de embriones en alpacas. Rev. Inv. Vet. del Perú. 1999. 10,1.
- Olmos R, Ancco E, Celiz H, Quispe C. Prueba de termorresistencia de espermatozoides epididimarios de equino congelado con dos crioprotectores. SPERMOVA. 2013; 3(1): 85 - 86
- Orozco V, Rosemberg M, Santiani A, Rodríguez H. Evaluación de tres dilutores para la refrigeración de semen de caballos. Científica 2011; 8(2):104-114
- Osorio C. El Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) desarrolló durante 2013 más de 1.500 embriones con alta calidad genética de la especie Holstein y Brown Swiss. 2013. Agraria.pe, 12 de Dic. 2013.
- Pacheco C. Efecto de la tripsina y colagenasa sobre el acrosoma espermatozoide y su relación con la fertilidad del semen de alpaca. Tesis Médico veterinario Zootecnista. Prog. Med. Vet. Zootec. Univ. Catol. Santa Maria, Arequipa, Perú, 1996. 52 pp.
- Pacheco J, Vélez V, Pezo D. Evaluación de la eficiencia de la transferencia de embriones interespecie entre alpacas y llamas obtenidos por ovulación simple evaluation of the efficiency of interspecies embryo transfer between alpacas and llamas obtained through single ovulation. Rev. Inv. Vet Perú 2016; 27(1): 64-69
- Pachaco O. Estudio comparativo del efecto de los dilutores Citrato de Sodio-Yema de huevo y Leche Homogeneizada, sobre la congelación de semen de bovino en nitrógeno líquido. Tesis Ing.Agrónomo UNALM. Lima Perú. 1964.
- Palomino L, Camacho J, Huanca W, Falcón F. Conservación de semen caprino en los dilutores Citrato-Yema y Leche Descremada Yema. Rev. Inv. Vet. Perú. 2001; 12 (1) : 1-7.
- Pereyra A. Determinación de costos en la transferencia de embriones de ganado vacuno en Yurimaguas. Tesis de grado. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Yurimaguas, Loreto. 2014;
- Pérez Durand Guido, Juan Cevallos Aragón, Javier Quintano Quispe. 2004. Sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (Lama pacos) colectados del conducto deferente en tres dilutores. XVII Congreso de Ciencias Veterinarias. Tacna. Perú.
- Pérez G. Inseminación artificial en camélidos sudamericanos. Desarrollo de la técnica. Seminario Internacional de Camellitos sudamericanos domésticos. Puno, Perú. 1997.
- Pérez y Pérez F. Reproducción Animal, Inseminación Artificial y Transplante de Embriones. Editorial Científico Médica. Barcelona, España. 1985. ISBN: 84-224-0805-8.
- Pérez U. Efecto de tres temperaturas de congelación de pajillas de semen de carnero en la viabilidad espermática. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina. 2011; 64 p.
- Pineda J, Pozo A, Huanca T, Naveros ML. Recuperación sucesiva de embriones y retorno folicular post lavado en alpacas (Vicugna pacos) Huacaya donadoras naturales. Spermova. 2012. 2(1): 53-54.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. Nature. 1949; 164:666-667.
- Quispe F. Efecto de dos dilutores, tiempo de equilibrio y raza sobre la motilidad de semen descongelado de ovino. Tesis de Magister en Producción Animal. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina. 1998; 73 p.
- Rengifo O, Murga L, Vásquez M, Alvarez Y, Chipana O. Efecto de dos dosis diferentes de eCG sobre la producción de embriones en vaquillas Holstein en condiciones tropicales. Spermova. 2011; 1(1): 111-112.
- Rodríguez CM. Efecto de medio Lactosa EDTA-plasma seminal en la criopreservación de espermatozoides de Equus caballus "potro". Tesis Universidad Ricardo Plama. Lima Perú. 2007.
- Ruiz J. Estado de la producción de embriones in vitro en camélidos sudamericanos. Spermova; 2015; 5 (2) : 264-269.
- Ruiz L, Santiani A, Sandoval R, Huanca W, Delgado A, Coronado L, Alzamora C. Efecto de dos antioxidantes (tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris. Rev Inv Vet Perú. 2007; 18 (2): 99-106.
- Salinas JL. Oferta y valoración genética en leche y carne de semen bovino importado y nacional en el Perú 2009-2014. Tesis Ing. Zootecnista. UNALM, Lima, Perú. 2016
- Salamon S, Visser D. Effect of Composition of Tris-Based Diluent and of Thawing Solution on Survival of Ram Spermatozoa Frozen by the Pellet Method. Australian journal of biological sciences.1972; 25(3):605-18.
- Sandoval R. Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. Tesis de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. 2005; 72 p.
- Smeaton DC, Vivanco HW. Potential benefits from new reproductive technologies in commercial dairy herds; a case study simulation. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production. 2001;61: 199-202.
- Suárez CP. Fertilidad de semen congelado de toros nacionales Holstein usando dilutores Leche-Yema, Tris-Yema y Triladyl. Tesis Magister Scientiae en Producción Animal. UNALM. Lima, Perú. 2015.
- Sumar J, Arellano P, Montenegro V, Londoño P, Picha Y, Rodríguez C, Sanchez D, Torres R. Reciprocal embryo transfer in alpacas and llamas. In: ICAR 2012. Satellite Meeting on Camelid Reproduction. Vancouver, Canada. 2012.
- Sumar J. Reproductive physiology in South American Camelids. In: Genetics of Reproduction in Sheep. R.B. Land and D W Robinson. Editors. Butterworth's. 1985. p: 81-95.
- Sumar J, Leyva V. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca. IV Con. Int. De Camélidos Sudamericanos. Abst. 12. 1981.
- Stockebrand CE. Desarrollo de una técnica asistida por laparoscopia para la recolección de embriones en ovejas. Tesis Médico Veterinario. Universidad Austral de Chile. Facultad de ciencias veterinarias. Instituto de reproducción animal. Valdivia. Chile. 2003
- Tapia D, Dueñas G, Gallegos A, Sarria J, Mellisho E. Inseminación laparoscópica con semen congelado en cabras criollas de Cañete-Lima. SPERMOVA. 2011; 1 (1): 129-130.
- Taylor PJ, Taylor S, James AN, Denniston RS, Godke RA. alpaca offspring born after cross species embryo transfer to llama recipients. Theriogenology. 2001; 55 (1): 401.
- Vargas P. Efecto del factor dilutor y raza en la integridad de la membrana espermática y acrosomal en semen crioconservado de carneros. Tesis Méd. Veterinario

- Zootecnista. Universidad Nacional del Altiplano, Puno. 2015; 74p.
- Vivanco HW, Ponce MD, Miguel MF, Asparrin M. Efecto de la aplicación exógena de oxitocina en la fertilidad obtenida por inseminación artificial con semen congelado en alpacas Huacaya con ovulación 2015. inducida. Congreso Mundial de Camélidos. Puno. Perú. 2015.
 - Vivanco HW, Ponce MD, Miguel MF, Osorio C. Desarrollo de la producción y criopreservación de embriones in vitro en alpacas. Proyecto FINCYT PIAP-2-P-233-14. 2015b.
 - Vivanco HW, Ponce MD, Miguel MF, Youngs C, Asparrin M. Embryo survival to calving according to type of embryo and embryo transfer method in alpacas. *Reproduction, Fertility and Development*. 27 (1).
 - Vivanco HW, Ponce MD, Asparrin M, Miguel MF. identificación de alpacas genéticamente mejoradas con mayor capacidad de reproducir características de fibra fina mediante el desarrollo de evaluaciones genéticas cruzadas y técnicas reproductivas de avanzada en el fundo Mallkini, en la comunidad campesina de Picotani y en SAIS Túpac Amaru. Informe final Proyecto 140-FINCYT-FIDECOM -PIPEA-2010. 2014.
 - Vivanco HW, Ponce MD, Miguel MF, Youngs C, Huamán E, León S, Asparrin M. Repetibilidad de la respuesta ovárica y de la producción embrionaria en alpacas huacaya superovuladas. *Spermova*. 2014B; 4(1): 77 - 79
 - Vivanco-Mackie HW. Strategies for Superovulation, Embryo production and Transfer in Sheep and Alpacas. *Proceedings 29th Annual Meeting A.E.T.E.- Istanbul, Turkey, 6th-7th September 2013*. Pages 43-74.
 - Vivanco HW. Transferencia de embriones en nucleos de ovinos de leche y doble proposito Embryo transfer *Spermova*. 2013B; 3(1): 41-44
 - Vivanco HW, Huamán E, León S, Gallegos A, Asparrin M, Alvarado E, Gamarra G. Evaluation of superovulatory regimes for in vivo embryo production in alpacas (Lama Pacos). *Reproduction, Fertility and Development*. 2009; 22 (1): 258
 - Vivanco HW, Ayala J, Huamán E, León S, Ponce D. Mejoramiento de la evaluación espermática mediante la innovación en el diseño de la colección seminal y el control de efectos fijos y aleatorios en alpacas huacaya del centro Munay Paqocha. Informe final contrato n°-228-2008-CONCYTEC-P
 - Vivanco-Mackie HW. Transferencia de Embriones en las especies ovina y caprina. En: *Biología de la Reproducción*. Gustavo A Palma, Editor. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. Primera Edición, 2001. Pags: 603-636. Gustavo A. Palma, Editor. Editorial: National Institute of Agricultural Technology. Argentina. First Edition. 2001. Pages: 603-636)
 - Vivanco-Mackie HW. Development and application of ovum pick up (OPU) and in vitro embryo production in the bovine. A view to arTech experiences. *Proceedings Australian Embryo Transfer Society Perth Conference "ET Beyond 2000"*. Observation City WA. 2000: 30-48
 - Vivanco HW, Olifent M, Forsyth J, Berg M, Saywell D, Li N, Tervit R. Production of Live Normal Calves from Embryo Reconstructs Generated by Nuclear Transfer of Blastomeres from In Vitro Produced Embryos. 14th International Congress on Animal Reproduction. Stockholm, 2-6 July 2000a. Abstracts 2, 19:15.
 - Vivanco HW. Transferencia embrionaria en Ovinos y Caprinos. *Memorias Seminario Internacional e Aplicación de Técnicas Biotecnológicas en la Reproducción de Ovinos y Caprinos*. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 1998. p 44- 92.
 - Vivanco HW, Greaney KB, Varela H. Explaining the variability in superovulation responses and yield of transferable embryos in sheep embryo transfers. *Theriogenology*. 1994; 41(1): 329
 - Vivanco HW. Greaney K. Comparison of bisected and whole sheep embryos transferred in-season and out of season. *Theriogenology*. 1992; 37 (1):316.
 - Vivanco HW, Donaire JC, Cardenas H. Evaluation of some factors influencing post freezing-thawing sperm motility of Peruvian Paso Horse frozen semen. *Proc. 11th Int. Cong. on Anim. Rep. and A.I. Dublin, Ireland 1988*; 3:307.
 - Vivanco HW, Alarcon VP. Artificial insemination of ewes with frozen semen in the Peruvian central Andes. *Proc. annual Meeting. Western Section. Am. Soc. Ani. Sci. Logan. Utah*. 1987; 38: 237
 - Vivanco HW, Roberts EM, Alarcon V, Ludeña E. Aplicación de la inseminación artificial con semen congelado australiano en ovejas Corriedale con celo inducido en la SAIS Pachacutec, Sierra Central del Perú, por inseminación intrauterina. *Proc. VIII Reunión Científica APPA. Huancayo. Perú*. 1985.
 - Vivanco HW, Chavez C, Nolte E. Artificial Insemination with frozen semen in goats in the north coast of Peru. *Proc. 3rd International Conference on Goats Production and Disease. Tucson, Arizona. USA*. 1982
 - Vivanco HW, Delgado E. Artificial Insemination in cattle under tropical conditions and estrus synchronization with PG -F2 Alpha. *Proc. 9th Int. Cong. on Anim. Reprod. and Artif. Insem. Madrid, Spain*. 1980.
 - Vivanco HW, Valera J. Deep freezing of ram semen with the TRIS diluent packaged in various systems. *Proc. IX International Congress on Animal Reproduction and artificial insemination. Madrid. Spain*. 1980
 - Vivanco HW, Vergara C. Freezing of Boar Semen. *Proceedings, 9th Int. Cong. on Anim. Reprod. and Artif. Insem. Madrid Spain*. 1980.
 - Vivanco HW, Zapata A. Artificial Insemination of the Peruvian Paso Horse. *Proc. 9th Int. Cong. on Anim. Reprod. and Artif. Insem. Madrid Spain*. 1980.
 - Vivanco HW, Angeles L, Chavez J. Colección, evaluación y conservación del semen de cuyes (*Cavia porcellus*). (Collection, evaluation and preservation of Guinea Pigs semen). *Proceedings, I Reunión Científica Anual, Asociación Peruana de producción Animal*. 1978. Lima, Perú.
 - Vivanco HW, Su Che J. Estudio comparativo de tres dilutores y tres diferentes temperaturas para la conservación del semen de porcino. *UNALM. Anales Científicos*. 1975. Vol.XII.#1-2
 - Vivanco HW, Espinoza A. Dilución del semen de bovinos con agua de coco para su conservación a temperatura ambiente en condiciones de trópico. *Proceedings, II Congreso Nacional de Investigadores Agrícolas y Pecuarios*. Lima Perú. 1974.
 - Vivanco HW, Valdivia J. Inseminación artificial con semen diluido con agua de coco vs. Monta natural y sincronización de celos con melengestrol acetato en ganado bovino en condiciones de selva. *Proceedings, II Congreso Nacional de Investigadores Agrícolas y Pecuarios*. Lima, Peru. 1974.
 - Vivanco HW, Díaz TL. Estudio comparativo entre monta natural e inseminación artificial en marranas. *Proceedings, II Congreso Nacional de Investigadores Agrícolas y Pecuarios*. Lima, Perú. 1974.
 - Wells DN, Misica DM, Forsyth JT, Berg MC, Lange JM, Tervit HR, Vivanco HW. The use of adult somatic cell nuclear transfer to preserve the last surviving cow of the Enderby Island Cattle breed. *Theriogenology*. 1999; 51 (1):217.

- Wilmut I, McWhir J, Campbell K. Nuclear transfer from cultured cells: a new opportunity in animal breeding? En: Milk composition, Production and biotechnology, Editores: Welch RAS, Burns DJW, Davis SR, Popay AI, Prosser CG. CAB International. Oxfordshire. 1997; 389-396.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997a; 385: 810-813.
- Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA, Moor RM. Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. *Cryobiology*. 1974. 11:560.
- Zhao XY, Li W, Lui L, Tong M, Hai T, Hao J, Guo CL, Ma QW, Wang L, Zeng F, Zhou Q. 2009. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Natura*. 2009; 461 (7260):86-90.