

INFLUENCIA DE LA RAZA DEL EMBRIÓN Y EL AMBIENTE ECOLÓGICO EN LA SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES OVINOS CONGELADOS POR TRANSFERENCIA DIRECTA

Embryonic survival according to the embryo's breed and the ecological environment of sheep embryos frozen for direct transfer

H. William Vivanco¹, M. Daniel Ponce¹, E. Roberto Díaz², Yuliana Bocángel², Iván Mesía², Yácomo Vizarreta³, Marlene Miguel¹, Gregory McCann⁴

¹ Vivanco International SAC. La Molina, Lima, Perú.

² Lactea SA, Virú, Trujillo, La Libertad, Perú.

³ Grupo Alviso SAC, Ayacucho, Huamanga, Perú.

⁴ Macquaire Artificial Breeders, Dubbo, NSW, Australia.

* Corresponding author
M. Daniel Ponce
E-mail:
daniepos83@hotmail.com

ABSTRACT

In Peru, there has been an introduction of new sheep breeds in order to reorient the production of this species, towards products of greater value and demand, which has taken on greater importance in the last 10 years. Thus, for the importation of these embryos it is required to comply with the strict sanitary regulations and quality control in the process. The objective of the study was to evaluate the embryonic survival of cryopreserved ovine embryos and transferred in one step to recipients located in two ecological environments. The ovine embryos (n = 190) cryopreserved were imported from Australia and used using the one-step freezing method for direct transfer. The number of embryos per breed were Dohne Merino (n = 70), East Friesian (n = 70) and Dorper (n = 50). The embryos were transferred surgically (ventral laparotomy with laparoscopic help) into the uterine horn ipsilateral to the ovary with the functional corpus luteum. Crossbred recipient ewes (East Friesian x Barbados Black Belly and Corriedale x Criollo) were synchronized in two ecological environments; Peruvian Coast (Trujillo, at sea level) and central Andean mountains (Ayacucho, 3 704 masl) respectively. The sheep embryos were distributed according to the number of recipients available in each ecological environments; Peruvian Coast (n = 150) and central Andean mountains (n = 40). Our criterion for determining embryonic survival was based on the birth of a live lamb. The results were analyzed by the Chi square test in the contingency table and subdivision of the contingency table. The overall rate of pregnant recipients was 43.15%. The survival rate of the embryos in the two ecological environments was statistically different (p < 0.05) between Peruvian coast (37.33%) and central Andean mountains (50.98%). The East Friesian breed showed the highest birth rates in two ecological environments, Peruvian coast (50%) and central Andean mountains (80%). The cryopreservation of embryos for direct transfer in sheep, is a repeatable and simple technique and with very good efficiency to achieve birth lambs in two ecological environments of Peru. Therefore, it allows the introduction of new breeds of sheep with high productive potential, minimizing costs.

Keywords: Direct transfer, frozen embryo, embryonic survival, ecological environment

RESUMEN

En el Perú, se han introducido nuevas razas ovinas para reorientar la producción de esta especie hacia productos de mayor valor y demanda, que ha cobrado mayor importancia en los últimos 10 años. Por lo tanto, para la importación de estos embriones se requiere cumplir con las estrictas regulaciones sanitarias y control de calidad en el proceso. El objetivo del estudio fue evaluar la sobrevivencia de embriones ovinos criopreservados y transferirlos en un solo paso a receptores ubicados en dos ambientes ecológicos. Los embriones ovinos (n=190) criopreservados se importaron de Australia y se procesaron con el método de congelación de un solo paso para la transferencia directa. El número de embriones por raza fue Dohne Merino (n = 70), East Friesian (n = 70) y Dorper (n = 50). Los embriones se transfirieron quirúrgicamente (laparotomía ventral con ayuda laparoscópica) al cuerno uterino ipsilateral al ovario con el cuerpo lúteo funcional. Las ovejas receptoras mestizas (East Friesian x Barbados Black Belly y Corriedale x Criollo) se sincronizaron en dos entornos ecológicos; Costa peruana (Trujillo, al nivel del mar) y andes central

(Ayacucho, 3 704 msnm), respectivamente. Los embriones de oveja se distribuyeron de acuerdo con la cantidad de recipientes disponibles en cada ambiente ecológico; Costa peruana (n=150) y andes centrales (n=40). Nuestro criterio para determinar la sobrevivencia embrionaria se basó en el nacimiento de un cordero vivo. Los resultados se analizaron mediante la prueba de Chi cuadrado en la tabla de contingencia y la subdivisión de la tabla de contingencia. La tasa general de receptoras paridas fue del 43.15%. La tasa de sobrevivencia de los embriones en los dos ambientes ecológicos fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) entre la costa peruana (37.33%) y los andes centrales (50.98%). La raza East Friesian mostró las tasas de natalidad más altas en dos ambientes ecológicos, la costa peruana (50%) y los andes central (80%). La criopreservación de embriones para transferencia directa en ovejas, es una técnica repetible y simple y con muy buena eficiencia para lograr corderos de nacimiento en dos ambientes ecológicos del Perú. Por lo tanto, permite la introducción de nuevas razas de ovejas con alto potencial productivo, minimizando los costos.

Palabras clave: Transferencia directa, embrión congelado, sobrevivencia embrionaria, ambiente ecológico

INTRODUCCION

En los últimos 10 años se ha venido implementando en el Perú la introducción de nuevas razas ovinas con el fin de reorientar la producción de esta especie hacia productos de mayor valor y demanda (carne de cordero, lana fina y quesos elaborados con leche de oveja). La introducción de las razas se viene efectuando a través de embriones congelados importados de países aprobados como exportadores por la autoridad sanitaria peruana. Entre las razas de interés para el Perú, son; la raza Dohne Merino (productora de lana fina), la raza East Friesian (productora de leche) y la raza Dorper (productora de carne de cordero).

La necesidad de contar con un método más simple para la descongelación y transferencia de embriones en el campo y dadas las dificultades o requerimientos del método convencional de congelamiento/descongelamiento y de vitrificación que requieren de medios de descongelación a diferentes concentraciones de crioprotector. Vivanco-Mackie, (2013) adaptaron para el ovino el método de congelamiento de "un solo paso" o "one step" (Leibo, 1982 y Renard et al. 1982) para transferencia directa, que rutinariamente es aplicado en el bovino. La metodología descrita por Merry et al. (1984) para descongelamiento de embriones ovinos en "un solo paso" tiene algunas similitudes, siendo la diferencia mayor, que la solución de descongelamiento incluyen sacarosa y no en la solución de congelamiento. Asimismo, Schiewe et al. (1991) describe comparaciones entre crioprotectores, tasas de congelamiento y tipos de envase, pero no usa deshidratación del embrión antes de congelar y utiliza descongelamiento por etapas y presenta resultados muy prometedores.

El objetivo del estudio fue evaluar la sobrevivencia de embriones ovinos criopreservados y transferirlos en un solo paso a receptores ubicados en dos ambientes ecológicos

MATERIALES Y MÉTODOS:

Producción y criopreservación de los embriones

Los embriones fueron producidos y criopreservados en el centro de producción de germoplasma de la Cía. Macquaire Artificial Breeders en la localidad de Dubbo, NSW, Australia. Se usaron tres carneros adultos, uno por cada raza (Dohne Merino, East Friesian y Dorper) para colección seminal y subsecuente inseminación laparoscópica con semen fresco a las ovejas donantes de la raza respectiva. Por lo tanto, todos los embriones dentro de cada raza tenían el mismo padre.

Las donantes fueron tres ovejas adultas por raza las cuales fueron sometidas a superovulación y colección embrionaria "in vivo" de acuerdo a los procedimientos descritos por Vivanco-Mackie (2001; 2013) y de acuerdo a los requerimientos sanitarios del SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria) de Perú.

Los embriones fueron colectados a los 6.5 días post inicio del celo de la donante y evaluados de acuerdo a los criterios de la "International Embryo Transfer Society" (IETS, 1998). Se seleccionaron sólo embriones de grado "1" en el estado de blastocisto (grado 6) o blastocisto expandido (grado 7) y con zona pelúcida intacta, los cuales fueron sometidos a criopreservación embrionaria de "un solo paso" para "transferencia directa".

Los embriones fueron colectados en DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Salin) y luego transferidos al medio de mantenimiento MDPBS (modified Dulbecco's phosphate buffered salin). Los embriones seleccionados fueron sometidos a lavado con solución Tripsina (solución al 25% v/v en MDPBS sin fuente de proteína) seguido por los lavados con MDPBS de acuerdo a los procedimientos estándar para exportación de la IETS (1998) para luego ser expuestos al medio de congelación compuesto por 1.5 M E.G. (Etilen glicol) y 0.1 M sacarosa en una base de medio de mantenimiento. Luego de su equilibrio (3 minutos) en medio de congelación se envasaron los embriones en pajuelas de 0.25 cc cargando la pajuela con los diferentes medios por fracciones separadas por burbuja de aire tal como se observa en la Figura 1.

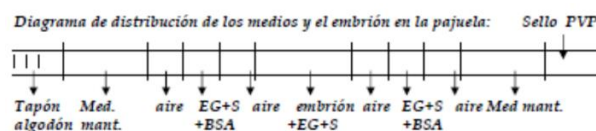


Figura 1. Distribución de los medios y el embrión en la pajilla. EG + S + BSA o EG + S = Medio de congelación; Med. Mant. = Medio de mantenimiento; PVP = Alcohol polivinílico en polvo.

Todo el proceso desde la colección hasta el momento de congelamiento se efectuó a una temperatura de 23°C tanto de los medios como del laboratorio. Las pajuelas conteniendo los embriones fueron luego congeladas usando un equipo de criopreservación "CRYOLOGIC"®. Las pajillas con embrión que estaban a 23°C directamente fueron colocadas en la cámara de congelador a -6°C y mantenidas por 10 min. Transcurridos los 2 primeros minutos a -6°C se hizo la inducción de hielo o

“seeding”. Al completarse los 10 minutos a -6°C se inició el descenso de temperatura a una tasa de 0.5°C por minuto hasta llegar a -35°C en que se sumergieron las pajuelas directamente a una caja de polietileno con nitrógeno líquido (a una temperatura de -196°C) para la manipulación de empaque.

Dentro de la caja con nitrógeno líquido las pajuelas fueron empacadas en tubillos y estos en cañas de sujeción las que fueron transferidas a las canastillas del contenedor de nitrógeno líquido para su exportación al Perú.

Transferencia de los embriones:

Las transferencias embrionarias se efectuaron en Perú usando receptoras ubicadas en dos localidades distintas: una en la costa peruana a nivel del mar en la provincia de Virú, Trujillo, en el norte del Perú ($8^{\circ}24'52''\text{S}$ y $78^{\circ}45'09''\text{O}$, temperatura media 18.9°C , temperatura máxima media 23°C , temperatura mínima media 14.9°C , precipitación anual 14 mm) y otra en los andes central a 3,704 msnm en la localidad de Condorcocha, Ayacucho ($13^{\circ}25'60''\text{S}$ y $74^{\circ}12'0''\text{O}$, temperatura media 16.4°C , temperatura máxima media 26.2°C , temperatura mínima media 6.0°C , precipitación 1,190.8 mm). Las receptoras usadas en la costa fueron ovejas cruzadas East Friesian x Barbados Black Belly y las de la sierra fueron ovejas cruzadas Corriedale x Criollo (nacidas y criadas en altura). En todos los casos las receptoras fueron ovejas en buena condición corporal, de edad adulta y con antecedentes de haber tenido al menos un parto y criado y destetado su cría satisfactoriamente. Las receptoras de la costa fueron mantenidas en sistema intensivo con alimentación de concentrados y las de la sierra al pastoreo en praderas naturales alto andinas. La sincronización de las receptoras, su preparación para la transferencia y las transferencias embrionarias se hicieron por el método quirúrgico con ayuda laparoscópica de acuerdo a protocolos ya descritos por Vivanco-Mackie (2001).

Para descongelar antes de la transferencia, cada pajuela conteniendo los embriones se retiró del contenedor de nitrógeno líquido y se expuso al aire por 3 a 5 segundos e inmediatamente, sumergiéndola en baño María a 35°C por 10 a 15 segundos. Posteriormente, se secó con papel toalla, se cortaron y el contenido fue descargado bajo visión microscópica en una placa Petri a 35°C .

Una vez identificados los embriones y verificando los embriones tengan buenas condiciones, se colocaron en una gota de medio de mantenimiento. Los embriones fueron cargados individualmente en los catéteres de transferencia embrionaria (TOM CAT® de 9 cm). El llenado de los catéteres de transferencia fue hecho por segmentos tal como se muestra en la Figura 2.

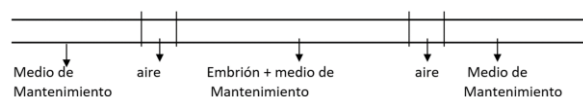


Figura 2: Llenado del catéter Tom Cat para transferencia quirúrgica.

Los embriones se transfirieron depositándolos en el lumen uterino de la porción superior del cuerno uterino de la receptora e ipsilateral al ovario con cuerpo lúteo funcional. Cada receptora recibió un solo embrión.

Las receptoras se observaron el retorno al celo a los 10 días post transferencia y las que no retornaron al celo se sometieron a confirmación de gestación por ultrasonografía a los 35 días post transferencia. Las ovejas preñadas fueron supervisadas durante la gestación, parto y lactación hasta el destete de sus crías.

El número de embriones transferidos por raza fue diferente en cada ambiente ecológico. En Trujillo se transfirieron 50 embriones de Dohne Merino, 50 de embriones East Friesian y 50 de embriones Dorper; en Ayacucho se transfirieron 20 embriones de Dohne Merino y 20 embriones de East Friesian. No se transfirieron embriones Dorper en la sierra por no estar considerada esta raza en los planes de reorientación genética para las praderas altoandinas a más de 3 mil metros de altura sobre el nivel del mar.

Análisis estadístico

El diseño experimental usado fue un diseño al azar con interacción de dos factores de evaluación: Localidad (Trujillo y Ayacucho) y raza de embrión (Dohne Merino, East Friesian y Dorper). El parámetro evaluado fue el porcentaje de ovejas que recibieron embrión y parieron un cordero vivo (sobrevivencia embrionaria hasta el nacimiento). Los porcentajes fueron comparados usando la prueba de tabla de contingencia de Chi Cuadrado y subsecuente subdivisión de tabla de contingencia en caso de haber diferencias significativas entre tratamientos (Zar, 1974; Dowdy y Wearden; 1983).

RESULTADOS

Los porcentajes de ovejas que recibieron embrión y parieron un cordero vivo (sobrevivencia embrionaria hasta el nacimiento) obtenidos en total y por ambiente ecológico se muestran en la tabla 1. En total 43.15% de los embriones transferidos resultaron en corderos vivos al nacimiento. A la prueba de Chi Cuadrado hubo diferencias significativas entre ambientes ecológicos ($p \leq 0.05$) siendo superior la tasa de sobrevivencia embrionaria en los andes centrales (Ayacucho con 50.98%) que en la costa peruana (Trujillo con 37.33%).

La comparación entre razas de embrión se muestra en la tabla 2. Al efectuar la prueba de Chi Cuadrado, se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre razas siendo la más alta sobrevivencia embrionaria la de la raza East Friesian (58.57%) seguida de la raza Dohne Merino (40.00%) y la más baja la de la raza Dorper (26.00%).

El análisis de interacción entre ambientes ecológicos y razas se muestra en la tabla 3. Al análisis estadístico por subdivisión de tabla de contingencia se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre grupos de interacción, siendo la sobrevivencia embrionaria más alta la obtenida con la raza East Friesian en los andes centrales (80.00%) seguida por la misma raza en la costa peruana (50.00%) y la más baja fue la obtenida con la raza Dorper en la costa peruana (26.00%). Para los embriones Dohne Merino se observa la misma tendencia que para la East Friesian, siendo la sobrevivencia de embriones Dohne Merino en los andes centrales es más alta (50.00%) que en costa peruana (36.00%).

Tabla 1. Resultados de sobrevivencia embrionaria hasta el nacimiento de acuerdo al ambiente ecológico.

Ambiente ecológico	# receptoras	Ovejas paridas	% ovejas paridas
Costa Peruana	150	56	37.33 b
Andes centrales	40	26	50.98 a
Total	190	82	43.15

Porcentajes con diferente letra entre paréntesis son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$)

Tabla 2. Resultados de sobrevivencia embrionaria hasta el nacimiento de acuerdo a la raza del embrión

Raza del embrión	# receptoras	Ovejas paridas	% ovejas paridas
Dohne	70	28	40.00 b
East Friesian	70	41	58.57 a
Dorper	50	13	26.00 d

Porcentajes con diferente letra entre paréntesis son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$)

Tabla 3. Resultados de sobrevivencia embrionaria hasta el nacimiento para las interacciones entre ambiente ecológico y raza de embrión.

Ambiente ecológico	Raza del embrión	# recept.	Ovejas paridas	% ovejas paridas
Costa Peruana	Dohne	50	18	36.00 c
	East Friesian	50	25	50.00 b
Andes centrales	Dohne	20	10	50.00 b
	East Friesian	20	16	80.00 a

Porcentajes con diferente letra entre paréntesis son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$)

DISCUSIÓN

El porcentaje total de sobrevivencia embrionaria hasta el nacimiento de los embriones congelados-transferidos en nuestro trabajo fue de 43.15% con una variación desde un mínimo de 36.00% para la raza Dorper en costa hasta un máximo de 80.00% para la raza East Friesian en los andes peruanos. La tasa global de partos con nacidos vivos de este trabajo, fue algo inferior al informado por Heyman et al. (1987) que obtuvieron 42 corderos nacidos vivos de 72 embriones congelados transferidos individualmente a ovejas receptoras (58.3%). Sin embargo, nuestro resultado para la raza East Friesian en Ayacucho (80.00%) es muy superior al resultado de Heyman et al., (1987) y al informado por Folch et al. (2000) que obtuvo 32.00 % de corderos nacidos. Muy pocos autores ofrecen resultados evaluados hasta el nacimiento; algunos se limitan a efectuar comparaciones de viabilidad embrionaria post congelamiento cultivando los embriones en laboratorio y otros informan sobre tasas de preñez al primer tercio de gestación y no hasta el nacimiento

por lo que no son comparables con nuestros resultados medidos al nacimiento de las crías.

Los resultados muestran un porcentaje de sobrevivencia embrionaria claramente superior para los andes centrales (50.98%) que para la costa peruana (37.33%) superioridad que se mantiene en el análisis de las interacciones de ambiente ecológico con raza de embrión ya que tanto la raza East Friesian como la Dohne muestran más alta sobrevivencia embrionaria en los andes peruanos que en la costa peruana. Comparaciones de sobrevivencia embrionaria en diferentes ambientes ecológicos no han sido informadas por otros autores. Sin embargo, se han identificado algunos factores que afectan la sobrevivencia embrionaria, como factores ambientales; altas temperaturas ambientales durante la gestación han sido reportadas como factor causante de mortalidad embrionaria en ovinos y otros rumiantes (Dutt et al. 1959; Dutt, 1964 ; Diskin y Morris, 2008), lo que podría explicar en parte el menor porcentaje de sobrevivencia obtenido en costa peruana versus andes centrales, ya que en la costa durante los trabajos de sincronización de receptoras, detección de celos y transferencia embrionaria, la temperatura media ambiental fue de 30°C mientras que en la sierra las temperaturas estuvieron dentro del rango de confort de los animales (18-22 °C).

No hay estudios que demuestren diferencias en sobrevivencia embrionaria debido a la altitud sobre el nivel del mar. Se ha informado sobre una serie de cambios adaptativos que ocurren en la fisiología de los individuos (humanos y animales) para asegurar su sobrevivencia en altura, la mayoría relacionados con los sistemas cardiovascular y respiratorio y con la actividad metabólica (Blaxter, 1978; Wetzel and Sylvester, 1983), los efectos de la altitud en la reproducción, aunque no están bien documentados. Ha sido comúnmente aceptado que la fertilidad del hombre y de los animales provenientes de ambientes de baja altitud se reduce al trasladarse a mayores alturas y continúa afectada a través de largos períodos de adaptación (Clegg, 1967). Sin embargo, la duración precisa de esos cambios no es conocida, no hay tampoco información disponible sobre la reproducción en hembras durante el proceso de adaptación y su comparación con la de individuos ya adaptados. En ovinos, Vivanco (1988) estudió entre otros, los efectos de la interacción entre el genotipo de los carneros y la altitud sobre el nivel del mar sobre una serie de parámetros reproductivos, encontrando que en general ninguno de los parámetros reproductivos evaluados fueron afectados por la altitud concluyendo que los machos nacidos y criados en altura y consecuentemente adaptados a la altura siempre y cuando tengan una alimentación adecuada no están limitados en la expresión óptima de sus características reproductivas y tienen un comportamiento reproductivo tan igual que los animales en costa. Nuestros resultados de sobrevivencia embrionaria en el presente estudio han sido superiores en los andes centrales (altura) que en costa peruana (nivel del mar) lo que demostraría que ovejas adaptadas a la altura tienen igual capacidad que ovejas en costa para preñar y mantener la preñez luego de la transferencia embrionaria.

Bradford (1972) señala que es el genotipo de la receptora y no la del embrión el que es responsable de la variación en sobrevivencia prenatal. Sin embargo, Pomp et al. (1989) afirman, lo contrario, es decir que la sobrevivencia prenatal de los embriones está influenciada más por el genotipo del embrión, aunque reconocen una cierta interacción con el genotipo de la receptora que es la que provee el ambiente para el desarrollo del feto. Nuestros resultados coinciden con los reportes de Pomp et al. (1989), ya que dentro de cada ambiente ecológico los embriones East Friesian sobrevivieron más independientemente de la raza de la receptora.

CONCLUSIONES

El método de congelamiento y transferencia de un solo paso es un método simple y capaz de producir porcentajes altos de sobrevivencia embrionaria hasta el nacimiento. La raza del embrión tiene un efecto significativo en la sobrevivencia embrionaria siendo superior la raza East Friesian. El ambiente ecológico tuvo un efecto significativo en la sobrevivencia embrionaria, siendo las ovejas adaptadas a la altura con igual o mayor capacidad de gestar y mantener la preñez luego de la transferencia embrionaria. La introducción de razas vía transferencia embrionaria con embriones congelados es factible y con resultados de sobrevivencia adecuados.

CONFLICTO DE INTERESES

No hay conflictos de intereses.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORES

Concepción y diseño del estudio (HWV), desarrollo de la metodología (HWV, MDP, ERD, YV, MM, GM), escribe, y revisa el artículo (HWV, MDP) y supervisión del estudio (HWV, MDP, ERD, YB, IM, YV, MM).

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio ha sido financiado por INNOVATE PERU y las compañías LACTEA SA, Vivanco International SAC y Green Sur Peruvian SAC, dentro del marco del proyecto "Mejoramiento de la productividad y calidad de lana, carne y leche ovina mediante la introducción de razas especializadas, la selección genética, heterosis y aplicación de técnicas reproductivas en rebaños de Trujillo y Ayacucho", Código N° PIPEA-7-P-086-018-13

REFERENCIAS

- Blaxter KL. The effect of simulated altitude on the heat increment of feed in sheep. *Br. J. Nutr.* 1978; 39:659
- Bradford GE. The role of maternal effects in animal breeding. VII Maternal effects in sheep. *Journal of Animal Science.* 1972; 35: 1324-1334
- Clegg EJ. Changes in body weight as a parameter of fitness in mice subjected to low atmospheric pressures. *Proc. 3rd Internat. Congress in Biometereology .* 1967; 184.
- Diskin MG, Morris DG. Embryonic and early fetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in Domestic Animals.* 2008; 43(2): 260-7.
- Dutt RH, Ellington EF, Carlton W. Fertilization rate and early embryo survival in sheared and unshaired ewes following exposure to elevated air temperature. *JAS.* 1959; 18 (4): 1308-10
- Dutt RH. Detrimental effects of high ambient temperature on fertility and early embryo survival in sheep. *International Journal of Biometeorology.* 1964; 8 (1) 47-9.
- Folch J, Olivera J, Aguilar B, Alabart JL, Sanchez P, Echegoyen E, Cocero MJ. Resultados obtenidos en la transferencia de embriones dentro del programa genético de la UPRA carnes Oviaragon. *Resúmenes de las XXV Jornadas SEOC.* 2000: 559-2.
- Heyman Y, Vincent C, Garnier V, Cognie Y. Transfer of frozen-thawed embryos in sheep. *Veterinary Record.* 1987; 120: 83-2.
- Leibo SP. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. In: *Proceedings 2nd International Congress of embryo transfer in mammals.* Anney, France. 1982; IV: 18-79
- Manual of the International Embryo Transfer Society. Third Edition. D.A. Stringfellow and S.M.Seidel Editors. 1111 North Dunlap Avenue. Savoy, Illinois 6184.USA. 1998.
- Merry DA, Bondioli KR, Allen RL, Wright RW Jr. One-step sucrose dilution of frozen-thawed sheep embryos. *Theriogenology.* 1984; 22(4):433-43
- Pomp D, Cowley DE, Eisen EJ, Atchley WR, Hawkins BD. Donor and recipient genotype and heterosis effects on survival and prenatal growth of transferred mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.* 1989; 86:493-7.
- Renard J, Heyman Y, Ozil J. Congélation de l'embryon bovin: Une nouvelle méthode de décongelation pour le transfert cervical des embryons conditionnés une seule fois en paillettes. *Ann. Med. Vet.* 1982; 126:23-32.
- Schieve MC, Rall WF, Stuart LD, Wildt DE. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and in situ dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology.* 1991; 36:279-293.
- Vivanco HW. Reproductive development to adulthood and some effects of breed and environment on the reproductive characteristics of ram in the central highlands of Peru. Thesis. PhD. Utah State University, Logan Utah, USA. 1988..
- Vivanco-Mackie HW. Transferencia de embriones en las especies ovina y caprina. In: *Biología de la Reproducción.* Gustavo A. Palma. Editor. Bs.As. Argentina. 2001.
- Vivanco-Mackie HW. Strategies for superovulation, embryo production and transfer in sheep and alpacas. 29th Annual Meeting A.E.T.E.- Istanbul, Turkey, 6th-7th September 2013. *Proceedings* pp 43-74.
- Wetzel RC, Sylvester JT. Gender differences in hypoxic vascular response of isolated sheep lungs. *J. Applied Physiol.* 1983; 55:1.
- Zar JH. *Biostatistical Analysis.* Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J. 1974.