

## IMPACTO DE LA INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN EN LA APLICACIÓN DE INSEMINACION ARTIFICIAL Y MULTIPLE OVULACION EN TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN CAMÉLIDOS

### Impact of ovulation induction in the application of artificial insemination and multiple ovulation and embryo transfer in camelids

T. Huanca<sup>1</sup>, J. Ccopa<sup>1</sup>, R.H. Mamani-Cato<sup>1</sup>, J. Sumar<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Innovación Agraria, Estación Experimental Agraria Illpa, Puno - Perú.

<sup>2</sup> IVITA. Universidad Nacional Mayor de San Marcos

\* Corresponding author

Address:  
xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

E-mail:  
thuanca@inia.gob.pe

#### ABSTRACT

The South American camelids are considered species of induced ovulation, so that the release of the oocyte is produced a neuroendocrine interaction is necessary, which is the product of the stimulation during copulation; However, several studies have demonstrated the presence of a factor in the seminal plasma of the male that is determinant for the occurrence of ovulation in camelids, has a powerful luteotropic effect of this factor, which is evidenced by the increase and permanence of the circulating LH concentrations and the rapid change in the vascularization of the pre ovulatory follicle and the developing corpus luteum. In llamas it was shown that the first significant increase in plasma LH levels occurs between 15 and 40 minutes after the start of intercourse, as a consequence of a neuroendocrine reflex. The neuronal stimuli that trigger this reflex involve the stimulation of the cervix during penetration, the sounds emitted by the male and the physical contact; however, the maximum LH peak occurs 2 to 3 hours after assembly, returning to basal levels after 7 to 12 hours of the same, ovulation occurs with similar frequency in both ovaries, if there is no stimulus Necessary from the mount will not ovulate and the dominant follicle will regress. Ovulation occurs if there is a dominant follicle of 7 mm or larger at the time of intercourse, but if the follicles are smaller than 6 mm or are in the regression phase, ovulation does not occur. In artificial insemination in semen-receiving females, seminal plasma, GnRH and vasectomized males have been used, results at the laboratory level reach 100% for seminal plasma followed by GnRH and vasectomized males, at the field level the percentage is lower, there is no significant difference to statistical analysis ( $P > 0.05$ ). In embryo transfer in embryo donors and recipients, seminal plasma and GnRH are most frequently used, the results show that it can be used indistinctively as an ovulation inducer ( $P > 0.05$ ).

**Keywords:** Alpacas, ovulation induction, seminal plasma, GnRH,

#### RESUMEN

Los camélidos sudamericanos son considerados especies de ovulación inducida, para que se produzca la liberación del ovocito es necesaria una interacción neuroendocrina, la cual es producto de la estimulación durante la cópula; Sin embargo, diversos estudios han demostrado la presencia de un factor en el plasma seminal del macho que es determinante para que se produzca la ovulación en los camélidos, tiene un potente efecto luteotrópico de este factor, lo que se evidencia con el incremento y la permanencia de las concentraciones circulantes de LH y el cambio rápido en la vascularización del folículo pre ovulatorio y el cuerpo lúteo en desarrollo. En llamas se demostró que el primer incremento significativo de los niveles plasmáticos de LH se produce entre 15 a 40 minutos después del inicio del coito, como consecuencia de un reflejo neuroendocrino. Los estímulos neuronales que desencadenan dicho reflejo involucran la estimulación del cérvix durante la penetración, los sonidos emitidos por el macho y el contacto físico; sin embargo, el máximo pico de LH se presenta a las 2 - 3 horas de la monta, retornando a niveles basales al cabo de 7 a 12 horas de la misma, la ovulación se produce con similar frecuencia en ambos ovarios, de no haber el estímulo necesario de la monta no se producirá la ovulación y el folículo dominante regresará.

La ovulación se produce si hay un folículo dominante de 7 mm o más grande al momento del coito, pero si los folículos son más pequeños de 6 mm o se encuentran en fase de regresión, la ovulación no se produce. En la Inseminación artificial en hembras receptoras de semen se viene utilizando plasma seminal, GnRH y machos vasectomizados, los resultados a nivel de laboratorio llegan al 100% para plasma seminal seguido por la GnRH y machos vasectomizados, a nivel de campo el porcentaje es menor, al análisis estadístico no existe diferencia significativa ( $P > 0.05$ ). En transferencia de embriones en donadoras y receptoras de embrión se utiliza con mayor frecuencia plasma seminal y la GnRH, los resultados demuestran que se puede utilizar indistintamente como inductor de la ovulación ( $P > 0.05$ ).

**Palabras clave:** Alpacas, inducción de ovulación, plasma seminal, GnRH.

## INTRODUCCION

La crianza de los camélidos sudamericanos constituye una actividad económica importante para el sostenimiento del poblador alto andino. Desde el tiempo del Incanato estas especies han sido utilizadas para la producción de carne y fibra, y también como medio de transporte de carga (Burton et al., 1969). Pese a la rusticidad y resistencia de estas especies, una limitante para su explotación es su baja eficiencia reproductiva. Por ejemplo, en alpacas, tienen una baja tasa de gestación, explicable tal vez por una alta tasa de mortalidad embrionaria que puede llegar hasta el 50% durante los primeros 35 días de gestación (Fernández Baca et al., 1970a). La secreción de progesterona por el cuerpo lúteo, es un factor determinante para el mantenimiento de una adecuada gestación (Sumar, 1988).

Los camélidos sudamericanos de acuerdo a la clasificación planteada por Conaway (1971), son considerados especies de ovulación inducida, en estas especies, es necesaria una interacción neuroendocrina, producto de la estimulación durante la cópula para que se produzca la liberación del ovocito (San Martín et al., 1968). Sin embargo, se han reportado la existencia de ovulaciones espontáneas en un rango del 3.5 %, cuando los folículos preovulatorios tienen un diámetro mayor a 6 mm (Bravo y Sumar, 1989). Esta situación de ovulación espontánea puede ocurrir por el contacto físico entre hembras y machos sin penetración (estímulos sensoriales) y/o efecto de la manipulación del tracto reproductivo de la hembra (ejemplo: ecografía transrectal) (Sumar, 1994; Ratto et al., 1997).

En los últimos años, diversos trabajos han demostrado la presencia de un factor en el plasma seminal del macho que es determinante para que se produzca la ovulación en los camélidos. Chen et al. (1985), propusieron la existencia de un factor inductor de ovulación en el plasma seminal de los camellos bactrianos, al encontrar ovulación en el 87 % de hembras a las que previamente les habían administrado plasma seminal por vía intramuscular. Basados en estos hallazgos y en la relación a la filogenética entre especies, un estudio realizado por Ríos (1968), sugirió la presencia de un posible agente inductor de ovulación con un efecto fisiológico muy importante en la reproducción de los Camélidos Sudamericanos, reportando la ovulación en alpacas luego de la aplicación intravaginal de plasma seminal de machos vasectomizados; estudios posteriores demostraron el potente efecto luteotrófico de este factor, lo que se evidencia con el incremento y la permanencia de las concentraciones circulantes de LH y el cambio rápido en la vascularización del folículo pre ovulatorio y el cuerpo lúteo en desarrollo (Adams et al., 2005; Ulloa-Leal et al., 2014).

Estudios realizados sobre los cambios hormonales en camélidos, demuestran que el máximo desarrollo del cuerpo lúteo se alcanza el día 8 post ovulación, lo que coincide con un aumento

en los niveles séricos del estradiol  $17\beta$  y la caída temporal de progesterona entre los días 9 y 11 post ovulación para luego volver a incrementarse en hembras gestantes o continuar cayendo en animales vacías (Adams et al., 1990; Aba et al., 1995). Estos cambios en los perfiles hormonales sugieren que posiblemente durante este lapso de días se produce el evento del reconocimiento maternal de la preñez.

## OVULACIÓN

En las especies de ovulación inducida los mecanismos que provocan la liberación del pico preovulatorio de LH no son del todo claras como en los ovuladores espontáneos donde la GnRH secretada por el hipotálamo controla los pulsos de LH. Un estudio realizado en llamas se demostró que el primer incremento significativo de los niveles plasmáticos de LH se produce entre 15 a 40 minutos después del inicio del coito, como consecuencia de un reflejo neuroendocrino. Los estímulos neuronales que desencadenan dicho reflejo involucran la estimulación del cérvix durante la penetración, los sonidos emitidos por el macho y el contacto físico (Bravo, 1994; Fernández-Baca et al., 1970a). El máximo pico de LH se presenta a las 2 - 3 horas de la monta, retornando a niveles basales al cabo de 7 a 12 horas de esta (Bravo et al., 1990; 1992; Aba y Forsberg, 1995; Aba, 1998). Recientemente se ha determinado la presencia de un factor inductor de la ovulación en el semen de naturaleza proteica (14 KDa y 12-23 AA) cuyo efecto es luteotrófico (Chen et al., 1985; Adams y Ratto, 2001; Ratto et al. 2012).

La ovulación como respuesta a la cópula requiere que el folículo dominante tenga un diámetro mayor a los 6 mm y se encuentre en fase de crecimiento (Adams et al., 1990). Se ha observado que cuando el diámetro folicular es menor o el folículo se encuentra en fase de regresión, la ovulación no se produce (Bravo et al., 1991). La ovulación se produce con similar frecuencia en ambos ovarios (Fernández-Baca et al., 1970a; Bravo et al., 1993; 1995), a pesar de que la mayor parte de las gestaciones se producen en el cuerno izquierdo. Aunque, no se ha demostrado el hecho que si el ovocito que proviene del ovario izquierdo determine mayor probabilidad de preñez (Vaughan et al., 2003). Además, se sabe que en los camélidos sudamericanos existen ovulaciones múltiples (Fernández-Baca et al., 1970a; Bravo et al., 1993), no se han reportado partos múltiples (San Martín et al., 1968; Fernández Baca, 1974).

## OVULACIÓN ESPONTÁNEA Y OVULACIÓN INDUCIDA

San Martín et al. (1968), propusieron en las alpacas, de manera similar a los camellos del viejo mundo, el proceso de ovulación, que se produce como respuesta a estímulos producidos durante el coito.

Muchas teorías sugieren que las especies de ovulación espontánea evolucionaron de las de ovulación inducida (Conaway, 1971; Bakker et al., 2000), otras hipótesis sugieren que la ovulación inducida evolucionó en ciertas especies como una forma de asegurar la conservación a través de un estado de receptividad constante que permita la máxima posibilidad de concebir cuando se está sometido a severas condiciones medioambientales (Larivière et al., 2003). Este podría ser el caso de los camélidos, quienes se originaron en América del Norte, pero se vieron obligados a cruzar el Estrecho de Bering durante la última glaciación (Wheeler, 1995).

Las especies de ovulación inducida, a diferencia de las espontáneas, incluye a aquellas en las cuales para que ocurra la ovulación se necesita un estímulo exógeno provocado durante el coito. Entre estas especies podemos mencionar a los conejos, hurones, gatos, camélidos sudamericanos y koalas. En cuanto al estímulo inductor se sabe que algunas especies solo necesitan una penetración y un solo eyaculado como en el caso de los conejos y los camélidos, pero en el caso de los gatos y los ratones de campo necesitan varias penetraciones y eyaculados para ovular (Tanco, 2011).

En ambos tipos de ovuladores, el crecimiento folicular se presenta en ondas, en el caso de las vacas puede presentar de 2 a 3 ondas de crecimiento folicular (Adams, 2007). En todas estas especies, la fase folicular se caracteriza por el reclutamiento de varios folículos de los cuales solo uno se convierte en el dominante e inhibe a los folículos restantes y crece, este en el caso de los ovuladores espontáneos llegará a ovular, no siendo así en el caso de los ovuladores inducidos, en los cuales de no haber el estímulo de la monta no se producirá la ovulación y el folículo dominante regresionará (San Martín et al., 1968; Fernández Baca., 1993; Sumar, 1996; Adams, 2005).

En Camélidos Sudamericanos la ovulación se produce, si hay un folículo dominante de 7 mm o mayor al momento del coito, pero si los folículos son más pequeños de 6 mm o se encuentran en fase de regresión, o la ovulación no se produce (Adams et al., 1990; Vaughan, 2004). Durante la fase luteal, las hembras no son receptivas al macho, pero si no hay preñez se produce la luteolisis. El cuerpo lúteo se puede detectar por ecografía 3 días después de la ovulación y alcanza su máximo diámetro 8 días después de la ovulación. En caso de preñez el cuerpo lúteo se mantiene a lo largo de toda la gestación la cual dura alrededor de 325 a 361 días en las alpacas y 331 a 361 días en llamas (San Martín et al., 1968; Sumar, 1988, 1996).

## PLASMA SEMINAL E INDUCCIÓN DE OVULACIÓN

El plasma seminal facilita el transporte de los espermatozoides a través del tracto reproductor masculino y femenino durante la copula. Además, contiene proteínas, citoquinas, factores de crecimiento y hormonas que tiene efecto sobre los espermatozoides y las funciones del tracto reproductivo de la hembra.

Pan et al., (2001) demostraron la existencia de una proteína asociada a la liberación de LH en el plasma seminal en camellos y cuya estructura molecular es completamente diferente a las formas nativas de LHRH, LH, HCG, PMSG y PGF-2 $\alpha$ . Pero, tiene una bioactividad similar al GnRH, esta proteína tiene propiedades luteotrópicas. Es así que se ha determinado que los cuerpos lúteos desarrollados después de la administración de plasma seminal (Adams et al, 2005; Palian, 2010) o FIO purificado (Silva et al, 2011; Ulloa-Leal et al,

2014) segregan sistemáticamente más progesterona que los inducidos después de aplicar GnRH.

La secreción de LH a partir de células de pituitaria cultivadas in vitro, después del tratamiento con plasma seminal de alpaca sugirió que el factor inductor de ovulación presente en el plasma seminal tiene un efecto similar a la GnRH a este nivel, pero que sin embargo no se trata de la misma molécula ya que inducen la liberación de LH de la hipófisis en diferente proporción. Por lo tanto se requieren mayores estudios para dilucidar la manera precisa como el Factor Inductor de Ovulación actúa sobre la hipófisis (Paolicchi et al., 1999; Bogle et al., 2012).

Adams et al. (2005) ratificaron los hallazgos de Ríos (1985), al experimentar con llamas y alpacas hembras, aplicando por vía intramuscular plasma seminal de alpaca, plasma seminal de llama y solución salina. Logrando la ovulación en las hembras que fueron tratadas con inyección intramuscular de 1 a 1,5 ml de plasma seminal de alpaca o llama. Posteriormente, se compararon el efecto inductor del plasma seminal versus la aplicación de un análogo de GnRH, encontrándose que la elevación en la concentración plasmática de LH inducida por la aplicación intramuscular de plasma seminal fue mayor y perduró más tiempo que la provocada por la aplicación IM de GnRH. Además, el cuerpo lúteo formado después del tratamiento con plasma seminal fue más grande que el cuerpo lúteo formado por inducción de ovulación por GnRH. La concentración de progesterona plasmática fue dos veces mayor en el grupo tratado con plasma seminal en comparación a las tratadas con GnRH. El tiempo promedio desde la aplicación de tratamientos hasta la ovulación fue de  $29,3 \pm 0,7$  horas. Estos estudios documentaron claramente la existencia de un factor inductor de la ovulación en el plasma seminal de llamas y alpacas, y sugieren, además, que el FIO y la GnRH son moléculas diferentes.

Otro estudio determinó que el efecto del plasma seminal es a nivel sistémico y no local (Ratto et al., 2005). En este estudio, un grupo de alpacas hembras fueron tratadas con 2 ml de plasma seminal por vía intramuscular, otro grupo por infusión intrauterina y un tercer grupo por infusión intrauterina seguido por legrado endometrial. La proporción de hembras que ovularon fue mayor en el grupo tratado por vía intramuscular (93%) en comparación con el grupo tratado de forma intrauterina (41%), mientras que el grupo tratado con infusión intrauterina y curetaje endometrial mostro un porcentaje intermedio entre los dos grupos anteriores (67%). Este estudio sugiere que el legrado endometrial puede facilitar la absorción del factor de inducción de la ovulación.

También, se ha demostrado la presencia del factor inductor de ovulación en el plasma seminal de las especies de ovulación espontánea (Ratto et al., 2006; López et al., 2006; Pan, 1992; O'Leary, 2006; Bogle et al., 2011), no siendo del todo clara aun la función que cumple en estas especies (Tribulo, 2012). Se ha reportado que un número considerable de llamas llega a ovular al ser previamente inyectadas con plasma seminal de toros (Ratto et al., 2006; López et al., 2006).

En estudios recientes en alpacas (Kershaw-Young et al., 2012), y en llamas (Ratto et al., 2012) se logró realizar la caracterización molecular y la identificación del factor inductor de ovulación, demostrando su naturaleza proteica de una masa molecular de 13.2 KDa, y 12-23 AA (Ratto et al. 2012), la cual es compatible con la neurotrofina conocida como Factor de Crecimiento Neural  $\beta$  ( $\beta$ -NGF). El mecanismo por el cual esta proteína induce la ovulación está mediado por un efecto directo a nivel central en el eje hipotálamo – hipofisario,

estimulando la secreción hipofisaria de LH por una acción anterior sobre las neuronas de GnRH del hipotálamo (Silva et al., 2011), siendo este efecto parcialmente modulado por la concentración periférica de estradiol (Silva et al., 2012), y dependiente de la dosis del FIO que indujo la ovulación (Tanco et al., 2011). Asimismo, 1/200 av parte de la concentración total del FIO de un eyaculado promedio, correspondiente a 60 µg de OIF purificado, es la dosis mínima que una vez administrada vía IM, induce una buena tasa de ovulación y el consiguiente buen desarrollo del cuerpo lúteo Tanco et al. (2011). Reyna (2013), encontró que la dilución 1:8 (vol/vol) de plasma seminal de alpaca en PBS, es la dilución mínima para producir ovulación.

### USO EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Un experimento conducido por Palian (2010), evaluó la tasa de concepción de alpacas inseminadas con semen fresco e inducidas ovulación con plasma seminal o un análogo de GnRH (Acetato de buserelina) (Tabla 1). Siendo el prerrequisito hembras con presencia de un folículo dominante  $\geq$  de 7 mm (detectado por ecografía transrectal). A un grupo de hembras (n=32), se realizó administración intramuscular de 2 ml de plasma seminal. Al otro de hembras (n=32), se realizó la administración intramuscular de 1 ml de un análogo de GnRH (0.0042 mg de acetato de buserelina). La inseminación artificial se realizó a 27 horas post inducción de ovulación con 1 ml de semen fresco diluido a una concentración espermática de  $130 \times 10^6$  por mL y una motilidad espermática  $\geq$  65%. La ovulación fue determinado ecográficamente al día 2 post inducción de ovulación. La preñez fue determinada al día 25.

Tabla 1. Tasa de ovulación y concepción de alpacas inseminadas, posterior a la aplicación de plasma seminal y GnRH (Palian, 2010)

Tratam.	Alpacas IA	Tasa de ovulación, %	Alpacas preñadas	Tasa de preñez, %
Plasma seminal	32	100.0	24	75.0a
GnRH	32	90,6	17	53.1b

a,b Letras diferentes en una misma columna presentan diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ )

En otro trabajo similar (Mamani et al., 2013), indujeron ovulación en alpacas con folículos  $\geq$  7 mm, utilizando plasma seminal (n=5) o 1 ml de un análogo de GnRH (n=5). La determinación del tamaño del cuerpo lúteo al día 8 post inducción de ovulación, se encontraron cuerpo lúteo del tamaño  $15.2 \pm 1.1$  mm y  $12.6 \pm 2.1$  mm, para los animales inducidos ovulación con plasma seminal y GnRH, respectivamente. Sugiriendo, que la administración de plasma seminal en alpacas induce un 100 % de ovulación en alpacas y mejoran la tasa de concepción en los animales inseminados, por un mejor efecto luteotrópico en la formación del cuerpo lúteo. Sin embargo, la fertilidad de alpacas inducidas ovulación con GnRH, plasma seminal y control, sometidas a monta natural no mostraron diferencias estadísticas (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de fertilidad al empadre controlado en alpacas utilizando GnRH y plasma seminal

Inductor de ovulación	n	Porcentaje de fertilidad
GnRH	53	41.51%
Plasma seminal	48	47.92%
Control	54	46.30%

a, b Letras similares en la misma columna no indican diferencia estadística significativa ( $p \geq 0.05$ )

### TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

La calidad de los embriones recuperados en un programa de superestimulación ovárica (MOET), tenían ligeramente mejor calidad cuando la ovulación fue inducida con GnRH versus plasma seminal (Tabla 3).

Tabla 3. Calidad de embriones, según tipo de inductor de ovulación (Huanca et al., datos no publicados)

Inductor de ovulación	Excelente	Bueno	Regular	Malo
GnRH	79/199 (39.7%)	58/199 (29.1%)	30/199 (15.1%)	32/199 (16.1%)
Plasma seminal	2/8 (25%)	5/8 (62.5%)	1/8 (12.5%)	0

En la Tabla 4, se observa la tasa de ovulación utilizando tres concentraciones de FIO en alpacas los cuales fueron de 80, 78 y 90% para las concentraciones baja, media y alta respectivamente. El porcentaje de gestación fue de 45, 51 y 40% para las concentraciones baja, media y alta respectivamente. Al análisis estadístico nos indica que la concentración de FIO no está relacionado con la tasa de ovulación ni el porcentaje de gestación en alpacas ( $p \geq 0.05$ ).

Tabla 4. Tasa de ovulación y gestación de alpacas utilizando tres tipos de concentración de FIO

Variable	Bajo	Medio	Alto
Tasa de ovulación	32/40 (80%)	62/80 (78%)	36/40 (90%)
Porcentaje de gestación	18/40 (45%)	41/80 (51%)	16/40 (40%)

### CONCLUSIONES

- Los Camélidos sudamericanos son considerados como especies de ovulación inducida para que se produzca la liberación de los ovocitos es necesaria una interacción neuroendocrina que es producto de la estimulación durante la cópula; sin embargo, existe la ovulación espontánea en un % menor al 3.5%.
- Existe un factor inductor de la ovulación en el plasma seminal que es determinante para que se produzca la ovulación cuando esta es administrada por vía intramuscular principalmente.

- Debido a la existencia en el plasma seminal de un efecto luteotrófico produce un incremento y la permanencia de las concentraciones circulantes de LH y el cambio rápido en la vascularización del folículo preovulatorio y el cuerpo lúteo en desarrollo.
- El máximo pico de LH se presenta a las 2 - 3 horas de la monta, retornando a niveles basales al cabo de 7 a 12 horas de esta. Aunque, la ovulación ocurrirá a las 29 horas post inducción.
- La ovulación como respuesta a la cópula requiere que el folículo dominante tenga un diámetro mayor a los 7 mm y se encuentre en fase de crecimiento, si es menor y se encuentra en la fase de regresión, la ovulación no se produce.
- La ovulación se produce con similar frecuencia en ambos ovarios. Sin embargo, mayor número de gestaciones se logra en el cuerno uterino izquierdo.
- Para efecto de la inducción de ovulación se puede utilizar plasma seminal, GnRH y/o macho vasectomizado indistintamente por los resultados que se obtiene en inseminación artificial y/o transferencia de embriones en camélidos domésticos.

## REFERENCIAS

- Aba M, Kindahl H, Forsberg M, Quiroga M, Auza N. Level of progesterone and changes in prostaglandin F2 $\alpha$  release during luteolysis and early pregnancy in llamas and the effect of treatment with flunixin meglumine. *Anim. Reprod. Sci.* 2000;59: 87 – 97.
- Adams G. Application of the bovine model for the study of ovarian function in other species. En: XX Reunión ALPA, XXX Reunión APPA-Cusco-Perú: Asociación Latinoamericana de Producción Animal - Asociación Peruana de Producción Animal. 2007; Pp: 7 – 19.
- Bakker J, Baum M. Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. *Front. Neuroendocrinol.* 2000; 21(3): 220-262.
- Bogle O, Ratto M, Adams G. Ovulation-inducing factor (OIF) induces LH secretion from pituitary cells. *Animal Reproduction Science* 2012. 133: 117– 122.
- Bravo W, Moscoso R, Alarcón V, Ordoñez C. Ejaculatory process and related semen characteristics. *Archives of Anthology.* 2002; 48: 65-72.
- Dissen G, Romero C, Hirshfield A, Ojeda S. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology.* 2001; 142(5): 2078-2086.
- Fowler ME. *Medicine and surgery of South American Camelids. Llama, Alpaca, Vicuña, Guanaco.* Iowa State University Press, Ames, 1989.
- Fowler M, Olander H. Fetal membranes and ancillary structures of llamas (*Lama glama*). *Am. J. Vet. Res.* 1990; 51: 1495-1500.
- Kastelic JP, Bergfelt DR, Ginther OJ. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology.* 1990; 33(6):1269-1278.
- Kershaw-Young C, Duart X, Vaughan J, Maxwell W $\beta$ . Nerve growth factor is a major component of alpaca seminal plasma and induces ovulation in female alpacas. *Reprod Fertil Dev.* 2012; 24:1093–7.
- Páñez S, Huanca W, Huanca T, Ratto M, Adams G. Efecto del sitio de deposición del plasma seminal sobre la tasa de ovulación y formación del cuerpo lúteo en alpacas. *Rev Inv Vet Perú.* 2009; 20 (1): 21-27.
- Palian J. Inducción de ovulación con plasma seminal o análogo de GnRH (acetato de Buselerina) y su efecto sobre la tasa de concepción en alpacas (Vicuña pacos), inseminadas con semen fresco. Tesis de Médico Veterinario. Lima. Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 2010. p 66. 84.
- Powell S, Smith B, Timmb K, Menino A. Estradiol production by preimplantation blastocysts and increased serum progesterone following estradiol treatment in llamas. *Animal Reproduction Science.* 2007; 102: 66–75.
- Ratto M, Huanca W, Singh J, Adams G. Local versus systemic effect of ovulation inducing factor in the seminal plasma of alpacas. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005; 3:29.
- Ratto MH, Huanca W, Singh J, Adams GP. Comparison of the effect of ovulation inducing factor (OIF) in the seminal plasma of llamas, alpacas, and bulls. *Theriogenology.* 2006; 66(5):1102-1106.
- Ratto M, Gomez C, Berland M, Adams G. Effect of ovarian super stimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Animal Reproduction Science.* 2007. 97: 246-256.
- Ratto M, Delbaere L, Leduc Y Pierson R., Adams G. 2012. Biochemical isolation and purification of ovulation-inducing factor (OIF) in seminal plasma of llamas. *Reprod. Biol Endocrinol* 9:24.
- Ríos M, Sumar J, Alarcón V. Presencia de un factor de inducción de ovulación en el semen de la alpaca y toro. Resúmenes 8va Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Huancayo, Peru. 1985. pp 40.
- Silva ME, Recabarren MP, Recabarren SE, Adams GP, Ratto MH. Ovarian estradiol modulates the stimulatory effect of ovulation-inducing factor (OIF) on pituitary LH secretion in llamas. *Theriogenology,* 2012: 77: 1873–1882.
- Sumar J. Efectos de los estímulos de inducción de la ovulación de alpacas y llamas. *Rev. Pec Inv IVITA –Perú.* 6(1): 1993. 17 -21.
- Sumar J, Leyva V. Determinación del Patrón anual de presentación de celos y ovulación espontánea. In Investigaciones en Camélidos Sudamericanos y Ovinos. Programa colaborativo de Investigación en pequeños rumiantes. Título XII – AID. 1997.
- Sumar J. Ovulación espontánea o efecto macho en alpacas y llamas. *SPERMOVA,* 2016. 6(1):30 – 35.
- Tanco M, Ratto M, Lazzarotto M, Adams G. Dose-Response of Female Llamas to Ovulation-Inducing Factor from Seminal Plasma. *Biol. Reproduct.* 2011. 85: 452–456.
- Tribulo P, Bogle O, Adams G. Bovine seminal plasma induces ovulation in llamas. *Reproduction, Fertility and Development.* 2012. 24(1): 176-177.
- Ulloa-Leal C, Bogle O, Adams G, Ratto M. Luteotrophic effect of ovulation inducing factor/nerve growth factor present in the seminal plasma of llamas. *Theriogenology.* 2014; 81: 1101–1107.