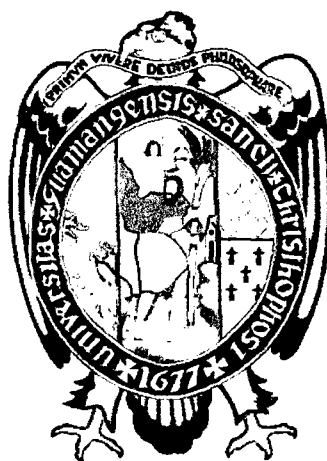


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE
HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE MEDICINA
VETERINARIA**



**PRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE EMBRIONES POR SUPEROVULACIÓN MEDIANTE LA
UTILIZACIÓN DE LA eCG Y FSH, EN ALPACAS HUACAYA (*Vicugna pacos*) a 2730 m.s.n.m.**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIA

PRESENTADO POR:

ROSSMERY MENDOZA VEGA

AYACUCHO – PERÚ

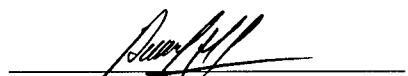
2012

**“PRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE EMBRIONES POR
SUPEROVULACIÓN MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE LA eCG
Y FSH, EN ALPACAS HUACAYA (*Vicugna pacos*) a 2730 m.s.n.m.**


Recomendado : 04 de mayo de 2012
Aprobado : 15 de junio de 2012




Mg. CARLOS ALBERTO PISCOYA SARMIENTO
Presidente del Jurado



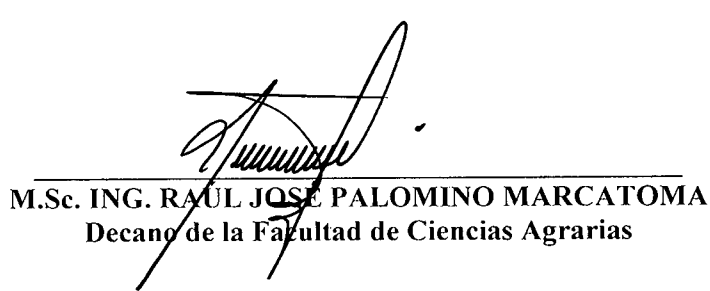
M.V. ALFREDO POZO CURO
Miembro del Jurado



Ph. D. JORGE ERNESTO GUEVARA VASQUEZ
Miembro del Jurado



M.V. GLORIA BETTI ADRIANZEN FACUNDO
Miembro del Jurado



M.Sc. ING. RAUL JOSE PALOMINO MARCATOMA
Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias

DEDICATORIA

*Con todo cariño para mis
queridos padres ELEODORO
y LEOVIGILDA, por su incomparable
sacrificio en mi formación Profesional.*

*Con amor a mis hermanos: CESAR, RONAL, y
demás personas que me apoyaron en el
presente trabajo de investigación.*

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, alma máter de mi Formación Profesional.

A la Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Formación Profesional de Medicina Veterinaria y al Laboratorio de Biotecnología y Reproducción Asistida de la Estación Experimental Agraria Canaán INIA – Ayacucho.

A los Docentes de la Escuela de Formación Profesional de Medicina Veterinaria, por sus valiosas enseñanzas y orientaciones que me condujeron a lograr mis objetivos.

Especial agradecimiento al D.M.V.Z.M.S.C. Teodosio Huanca Mamani, por su valioso aporte y colaboración como Co-asesor, durante el desarrollo de la parte experimental del presente trabajo de investigación.

Al M.V. *Alfredo Pozo Curo*, por su asesoramiento y conducción del trabajo de tesis.

A todas las personas, que de una u otra manera colaboraron con sus sugerencias en el desarrollo y culminación del Trabajo de Investigación.

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1.1. Antecedentes	3
1.2. Anatomía del aparato reproductor de la hembra	6
1.3. La pubertad	8
1.4. La ovulación en las alpacas	9
1.5. Control neuroendocrino del ciclo reproductivo en la alpaca	10
1.6. Dinámica folicular en camélidos sudamericanos	11
1.7. Control de la dinámica de crecimiento folicular	13
1.8. Actividad Luteal	14
1.9. Comportamiento sexual	16
1.10. Estacionalidad reproductiva	17
1.11. Hormonas utilizadas para inducir Superovulación en camélidos	19
1.12. Inducción de la ovulación	23
1.13. Superestimulación ovárica	24
1.14. Superestimulación ovárica durante una fase luteal natural	26
1.15. Superestimulación ovárica durante una fase luteal artificial	26
1.16. Superestimulación ovárica durante la fase de Receptividad sexual	27
1.17. El empadre	29
1.18. Lavado y recuperación de embriones	30
1.19. Clasificación de embriones	31

1.20. Influencia del tratamiento superovulatorio en la posterior fertilidad de la hembra donante	33
1.21. Influencia de la alimentación en la reproducción	33
CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	35
2.1. Lugar de Estudio	35
2.2. Duración del Trabajo	36
2.3. Materiales	36
2.4. <i>Etapas o fases</i>	39
2.4.1. Fase Pre – Experimental	39
2.4.2. Fase Experimental	40
2.5. Parámetros a Evaluar	46
2.5.1. Respuesta folicular, por hembra	46
2.5.2. Respuesta luteal, por Hembra	46
2.5.3. Respuesta embrionaria, por Hembra	46
2.6. Diseño Estadístico	47
CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
3.1. Evaluación de la respuesta folicular	49
3.2. Evaluación de la respuesta luteal	54
3.3. Evaluación de la respuesta embrionaria	57
CAPITULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	64
RESUMEN	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 3.1: Número promedio de folículos superestimulados, según tratamiento hormonal en alpacas huacaya.	49
Cuadro 3.2: Tamaño promedio de folículos (mm), según tratamiento hormonal en alpacas huacaya.	51
Cuadro 3.3: Tasa de ovulación, según tratamiento hormonal en alpacas huacaya.	53
Cuadro 3.4: Número promedio de cuerpos lúteos, según tratamiento hormonal en alpacas huacaya.	54
Cuadro 3.5: Tamaño promedio de cuerpos lúteos, según tratamiento hormonal en alpacas huacaya.	56
Cuadro 3.6: Número de embriones recuperados post superestimulación ovárica, según tratamiento hormonal en alpacas huacaya.	57
Cuadro 3.7: Tasa de recuperación de embriones post superestimulación ovárica, según tratamiento hormonal en alpacas huacaya.	59
Cuadro 3.8: Contingencia del tratamiento hormonal de la hembra, sobre el estado del embrión en alpacas huacaya.	60
Cuadro 3.9: Contingencia del tratamiento hormonal de la hembra, sobre la calidad del embrión en alpacas huacaya.	62

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de investigación pretendió conocer la fisiología reproductiva de los camélidos, desarrollando protocolos de estimulación ovárica para la inducción del crecimiento folicular múltiple a través de diferentes tratamientos hormonales.

La poca eficacia de programas de mejora genética y los esquemas de crianza tradicional basados en apareamientos no programados y la elevada consanguinidad, han provocado un deterioro de la calidad genética de los animales, reflejada en la calidad de la fibra producida. Por lo cual el desarrollo de biotecnologías reproductivas, nos permitirá desarrollar una herramienta para aplicarla adecuadamente en programas de mejoramiento genético a través de la producción de embriones viables obtenidos a partir de las hembras genéticamente superiores y su posterior transferencia al resto de la población. Este procedimiento conlleva a mejorar la calidad de estos animales y directamente la vida de sus productores.

La superovulación, ha demostrado ser una buena técnica en los Programas de Mejora Genética, al permitir acortar los intervalos generacionales, incrementar el número de descendientes a partir de estos animales y facilitar la diseminación de las características genéticas ligadas a la producción. Sin embargo; el grado de desarrollo alcanzado por ésta técnica en esta especie es inferior, y ello es consecuencia de que la mayor parte de los trabajos en los que se estudia la fisiología reproductiva son relativamente recientes, por lo que los conocimientos existentes son escasos a las de otras especies de rumiantes (bovinos, ovinos y caprinos).

El presente trabajo de investigación titulado **“Producción y Evaluación de Embriones por Superovulación mediante la utilización de la eCG y FSH en alpacas Huacaya (*Vicugna pacos*) a 2730 m.s.n.m”** tuvo los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Evaluar dos protocolos de superestimulación ovárica para la obtención de embriones viables en alpacas huacaya a 2730 m.s.n.m.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la respuesta ovárica al tratamiento hormonal superovulatorio en función al número y tamaño de folículos, cuerpos lúteos y tasa de ovulación.
- Evaluar el efecto de la superovulación, utilizando FSH (Hormona Folículo Estimulante) y eCG (Gonadotropina Coriónica equina), en la producción y calidad embrionaria.

CAPITULO I

REVISION BIBLIOGRÁFICA

1.1. Antecedentes

Los primeros trabajos de investigación en camélidos sudamericanos se iniciaron a partir de la década del 60, como una alternativa tecnológica de respuesta a las necesidades de las grandes haciendas, posteriormente el de las empresas y finalmente al de las comunidades campesinas (Adams y Col., 1989).

La utilización de las biotecnologías reproductivas en el Perú es reciente, por lo tanto, debe realizarse mediante el esquema de núcleos de reproductores en áreas geográficas claves de tal manera que sirvan como foco de desarrollo (Alvarado, 2003).

La superovulación y transferencia de embriones son biotecnologías que alcanzaron su máximo desarrollo a comienzos de 1980 y que cuentan con una generación anual de 739,356 embriones, con un total de 520,712 embriones

bovinos transferidos en el mundo, estableciéndose un record en el año 1999 (Aba, 1995).

La primera cría de alpaca nacida por transferencia de embriones lo obtuvo Sumar y Franco (1974) y posteriormente se comienza a utilizar una técnica no quirúrgica para la recogida de embriones, realizando el lavado del útero a los 7 días de la monta, dichos embriones fueron transferidos en fresco permitiendo el nacimiento de una cría. (Bourke y Col., 1995).

En un trabajo en el que realizó la recogida de embriones en alpacas, 3 días después de la inyección de 1000 UI de hCG (Gonadotropina Coriónica Humana) se recuperaron 31 embriones de un total de 126 ovulaciones, dichos embriones se encontraban en el estadio de 2 a 8 blastómeros (Novoa y Col., 1999).

En un trabajo hecho en llamas se recuperó 37 embriones a partir de 47 hembras no estimuladas (79%) y al ser transferidas a otras hembras receptoras se obtuvo una tasa de concepción del 47% (Taylor y Taylor, 2000).

Se realizó un estudio sobre la morfología de los embriones de la alpaca de la raza huacaya del tercer al décimo día de gestación temprana, en el cual utilizando dos grupos: Grupo Control (sin superestimulación) y el Grupo de superestimuladas con eCG; determinando que en el 100% de los casos en hembras control, se encontró un solo embrión; y en hembras estimuladas con eCG, se pudo recolectar un promedio de 3.9 ± 3.17 embriones (Cosio, 2000).

En un estudio preliminar evaluaron un protocolo de vitrificación de embriones de alpaca sobre la calidad embrionaria de éstos, dos hembras donadoras recibieron un tratamiento de superovulación con eCG y fueron montadas naturalmente, siete días después se realizó el lavado uterino no quirúrgico. Se recuperaron 9 embriones en estadio de blastocisto y clasificados, encontrándose ocho embriones de buena calidad morfológica las cuales fueron transferidos a 8 alpacas receptoras previamente sincronizadas, sin embargo a la evaluación ecográfica ninguna hembra resulto preñada (Vásquez y Col., 2007).

Realizaron un estudio sobre el efecto del tratamiento de progesterona- eCG sobre la calidad embrionaria en llamas, utilizando 30 llamas, las que fueron divididas en dos grupos: Grupo A (sin tratamiento) y Grupo B (tratamiento con eCG), la ovulación fue inducida en ambos grupos mediante monta natural y aplicación de 1 ml de GnRH. En el grupo A se recuperaron 5 embriones (31.25%), mientras que en el grupo B se recuperaron 20 embriones (21.98%). El 60% de los embriones del grupo A fueron clasificados como grado 1, mientras que el 40% de los embriones del grupo B fueron clasificados con grados 2, 3 y 4. No se encontraron embriones considerados intransferibles, con lo que se concluyó que el tratamiento hormonal con eCG no afecta la calidad de embriones de llama (Evangelista y Col., 2007).

En un trabajo realizado para determinar el momento óptimo para recuperar embriones del útero de alpaca mediante método no quirúrgico, determinó, que

las alpacas superovuladas con eCG están presentes en los cuernos uterinos al día 6 post cópula siendo posible su recuperación no quirúrgica a partir de ese día (Cervantes, 2008).

1.2. Anatomía del aparato reproductor de la hembra

El tamaño y la forma de los ovarios varían con la edad y con su contenido en folículos y cuerpos lúteos, cuya longitud oscila entre los 5 y 12 mm, su peso entre los 1,9 y 2,4 g de forma ovalada o circular, aplanados lateralmente, y presentan una superficie irregular por la presencia de numerosos folículos cuyo diámetro está comprendido entre los 3 y 5 mm (Elwishy, 1992).

La presencia de folículos maduros y, sobre todo, de cuerpos lúteos le confiere al ovario un aspecto lobulado. Cada ovario está rodeado completamente por un largo pliegue del mesosalpinx con forma cónica denominado *bursa ovari*, cuya porción apical forma un amplio orificio circular que comunica con la fimbria del oviducto (Bravo y Col., 1991).

Los oviductos son dos conductos delgados y tortuosos, de 15 a 20 cm de longitud, que comunican la superficie del ovario con el útero. Cada uno se une a un cuerno uterino a través de un estrecho orificio que forma una papila protuberante y esta estructura, denominada istmo, que actúa como un esfínter para evitar movimientos retrógrados de los fluidos contenidos en el útero. Las funciones del oviducto son diversas, destacando la captación del ovocito proveniente del ovario, el transporte y almacenamiento de los espermatozoides

depositados en el útero, proporcionar el ambiente adecuado para que se produzca la fecundación y el inicio del desarrollo embrionario (Sumar, 1985).

El útero de la alpaca es bicornes, con forma de "Y", presentando dos cuernos uterinos con una longitud media de 7,5 cm y un cuerpo muy corto, en las hembras no gestantes el órgano se localiza en el interior de la pelvis. El cuerno uterino izquierdo es más grande, esta diferencia se acentúa en las hembras multíparas como consecuencia de que el 98% de las gestaciones tienen lugar en el cuerno izquierdo, la mucosa uterina está formada por un epitelio cilíndrico y la submucosa por un tejido fibroso denso que contiene pequeñas glándulas uterinas. El tono y el edema del útero se incrementan durante la fase folicular, manteniéndose relajado y homogéneo durante la fase luteínica (Fernández-Baca y Col., 1972).

La cervix es similar al de la vaca, contiene 2 ó 3 pliegues anulares y su longitud oscila entre los 2 y 5 cm, el grado de apertura o cierre está sometido a regulación endocrina, de manera que su luz se dilata durante el celo para facilitar la cópula, mientras que se estrecha durante la gestación para evitar la contaminación del útero mientras se completa el desarrollo embrionario o fetal. Se protruye en la vagina, formando dos sacos ciegos, uno dorsal y otro ventral (Sumar, 1985).

La longitud de la vagina varía entre 13 y 15 cm y su diámetro está comprendido entre 3,5 y 5 cm y se caracteriza por tener una mucosa que forma numerosos pliegues. Es una estructura extensible, por lo que a medida que avanza la

gestación, el peso del útero ocasiona la desaparición de los mencionados pliegues. El himen, o sus restos, marcan la separación entre la vagina y la vulva. La longitud de la vulva es de unos 3 cm y el clítoris es muy pequeño (Novoa, 1991).

1.3. La pubertad

La mayor parte de las hembras alpaca muestran receptividad sexual entre los 12 y 14 meses, a pesar de haberse comprobado que la actividad ovárica (presencia de folículos con un diámetro superior a los 5 mm) se inicia a edades más tempranas (Novoa, 1991).

La aparición de la pubertad está supeditada a las condiciones ambientales, especialmente a la situación nutricional. Así, la pubertad se produce cuando el animal alcanza el 60% del peso corporal de un adulto, lo que supone unos 33-36 kg (Sumar, 1985; Smith, 1985).

La primera gestación se inicia a partir de los 2 años de edad, lo que unido a la tasa de natalidad media es aproximadamente del 50% en estos animales, determina que únicamente la mitad de los mismos produzca su primera cría a los 3 años, mientras que el resto no lo hace hasta los 4 años de edad (Fernández-Baca y Col., 1974). Sin embargo, cuando las condiciones nutricionales son adecuadas es posible lograr que las hembras inicien su primera gestación a los 12 meses de edad, obteniéndose una buena fertilidad (Fernández-Baca y Col., 1972; Novoa y Col., 1972).

Se ha comprobado que cuando las hembras de un año, que presentan buen desarrollo corporal, se mantienen durante 3 días consecutivos con machos adultos (4 a 6 años), es posible alcanzar porcentajes de fertilidad del 96.1%, cifras similares a las obtenidas con hembras adultas (Condorena y Velasco, 1977).

1.4. La ovulación en las alpacas

Los camélidos son especies de ovulación inducida por la cópula, su estímulo proporciona el impulso nervioso necesario para desencadenar la secreción hipofisaria de la hormona luteinizante (LH), responsable de causar la ruptura folicular y la consiguiente liberación del óvulo (Fernández – Baca y Col., 1971).

Se ha definido como ovulación inducida por la monta, tanto en la llama como en la alpaca a la *ruptura folicular (ovulación)*, que ocurre alrededor de las 26 horas después de la monta y ambos ovarios tienen igual tasa de ovulación (Englands y Col., 1969).

La ovulación puede ocurrir 26 a 30 horas después de la monta o puede ser inducida artificialmente entre las 24 – 30 horas post inyección de Gonadotropina Coriónica humana (hCG), de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y de LH (Adams y Col., 1992).

La cópula es relativamente larga en los camélidos sudamericanos, con períodos variables y existen trabajos que refieren que a mayor tiempo de duración de la cópula se obtiene mayor porcentaje de alpacas que ovulan. Sin embargo; se ha

encontrado que en varios casos, hembras con más de 20 minutos no llegan a ovular mientras que en otras con 5 minutos si lo hacen (Vivanco y Col., 1985).

1.5. Control neuroendocrino del ciclo reproductivo en la alpaca

La hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es el neuropéptido clave que controla la función reproductiva en todas las especies de vertebrados, es sintetizado y luego almacenado en el hipotálamo medio basal el cual *proporciona un enlace humoral entre los sistemas neural y endocrino*. En hembras de ovulación inducida (conejos, hurones, gatos y camélidos), la liberación preovulatoria de GnRH y el resultante surgimiento preovulatorio de LH, es inducido por el estímulo sensorial genital durante la monta (Novoa y Col., 1999).

En especies de ovulación espontánea la liberación de GnRH es inducida por esteroides ováricos, los que estimulan secreción pulsátil de GnRH hacia la eminencia media y este se traduce en un estímulo para la secreción pulsátil preovulatoria de LH (Hafez, 2000).

Es importante el rol que juega el estradiol en ovuladores espontáneos en la función neuroendocrina, no obstante se ha reportado que las neuronas de GnRH no poseen receptores para esteroides. Por lo tanto, estos últimos no podrían estimular la síntesis de GnRH directamente, sin la participación de neurotransmisores (Bhat y Col., 1998).

Las neuronas noradrenérgicas proyectan estímulo al hipotálamo medio basal y cuando éste está activado promueve la liberación de GnRH en terminales nerviosos de la eminencia media y es conducida a través del sistema hipotálamo – hipofisiario hasta la hipófisis anterior y es aquí donde la GnRH estimula la liberación de las Gonadotropinas: hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH), las cuales regulan la esteroidogénesis y la maduración de gametos (Hafez, 2000).

El rol principal de la secreción de la LH es la inducción de la ovulación después de la cual se produce la luteinización de las células del folículo ovulatorio y comienza la secreción de P_4 , la cual tiene un efecto de retroalimentación negativa en el hipotálamo, al prevenir la secreción de GnRH y desensibilizar los gonadotrofos de la hipófisis a la acción de GnRH. (Hafez, 2000).

Otra sustancia que actúa como neurotransmisor en la regulación del eje hipotálamo - hipófisis es el leptín, que es una proteína sintetizada en el tejido adiposo y secretada a la circulación (Zieba y Col., 2004).

1.6. Dinámica folicular en camélidos sudamericanos

En alpacas y llamas hembras no expuestas al macho, desarrollan ondas foliculares sucesivas, en tres fases de desarrollo, para lo cual, un grupo de folículos son reclutados, de ellos es seleccionado uno e inicia su crecimiento, diferenciándose y alcanzando el tamaño ovulatorio (≥ 7 mm de diámetro);

mientras que los demás regresionan. En la fase de maduración el folículo dominante inhibe el desarrollo de los folículos más pequeños, reportándose una relación inversa entre el diámetro del folículo dominante y el número de folículos pequeños (Bravo y Col., 1990).

Con respecto al largo de la onda folicular en camélidos sudamericanos, se determinó un promedio total de 13.8 días, siendo para el estadio de crecimiento 4.8 ± 1.5 días; de maduración 5 ± 1.6 días y para el de regresión 4.0 ± 1.1 días, encontrándose variaciones de 22.6 ± 2.5 días con respecto al largo de onda; fase de crecimiento (desde 3 mm a su máximo diámetro) de 9.2 ± 2.8 días; maduración de 5.2 ± 1.4 días y regresión de 8.2 ± 2.2 días; estas diferencias encontradas se deberían al estado lactacional de los animales empleados (Adams y Col., 1990).

El intervalo entre ondas foliculares, es decir el período entre la emergencia de folículos dominantes sucesivos, en promedio en alpacas es de 15.8 ± 0.6 días y en llamas de 18 ± 2.6 días, se sugiere que la extensión de estos intervalos varía en relación al diámetro del folículo dominante, es decir, un menor intervalo estaría asociado con el menor diámetro del folículo (Vaughan, 2001).

El desarrollo de la onda folicular en alpacas se da de manera alterna en ambos ovarios, esto se comprueba con la presencia del folículo dominante en ambos ovarios en un 85%, detectándose después de la ovulación el cuerpo lúteo en

llamas en el ovario derecho en 51%, ovario izquierdo en 47% y en ambos 2% (Sumar, 1993).

1.7. Control de la dinámica de crecimiento folicular

En camélidos, la sincronización de las oleadas de crecimiento folicular, se realiza con tres objetivos: Asegurar la presencia de un folículo preovulatorio en el momento de la monta, o de lo contrario asegurarnos de que un tratamiento superovulatorio se inicia durante el comienzo de una oleada de crecimiento folicular y en ausencia de un folículo dominante, y por último sincronizar el ciclo de la hembra donante y las receptoras en un programa de transferencia de embriones (Vaughan y Col., 2004).

La progesterona y los progestágenos han demostrado ser eficaces en el control y sincronización de las oleadas de crecimiento folicular en diferentes especies. Esta hormona al ser secretada durante una fase luteal o durante la gestación altera la dinámica de crecimiento folicular, reduciendo el tamaño alcanzado por el folículo dominante y acortando la duración de la oleada en las llamas (Lauderdale y Zilbelman, 1974).

La administración de 50 mg diarios de progesterona durante 13 días consecutivos, altera la dinámica de crecimiento folicular y provoca el inicio de una nueva oleada a los 7 días de finalizar el tratamiento (Alberio y Aller, 1996).

La aplicación de dispositivos intravaginales impregnados con 0,33 g de progesterona (CIDR) durante 7 días provocó la supresión del crecimiento

folicular por encima de los 7 mm y la aparición de una nueva oleada de crecimiento folicular a los $5,0 \pm 1,0$ días de la finalización del tratamiento (Chaves y Col., 2002).

La administración de estradiol en una dosis de 0,5 o 2 mg indujo regresión del *folículo dominante* y *una nueva oleada de crecimiento folicular* con el desarrollo de un nuevo folículo preovulatorio al cabo de 10 a 12 días del tratamiento (Ratto y Col., 2003). Otro método utilizado para la sincronización de las oleadas de crecimiento folicular se basa en la inducción de la ovulación del folículo dominante administrando LH, lo que permite el desarrollo de un nuevo folículo dominante al cabo de $5,2 \pm 0,5$ días de tratamiento (Ratto y Col., 2003).

1.8. Actividad Luteal

El cuerpo lúteo se desarrolla en el ovario a los 5 días de la cópula, observándose una elevación de los niveles de progesterona entre los 4 y 6 días después del coito y alcanza su tamaño máximo (10 a 15 mm) entre 8 días después del coito, coincidiendo con los niveles máximos de progesterona. A partir de los 4 días de la ovulación puede visualizarse el cuerpo lúteo con relativa facilidad utilizando ecografía transrectal (Sumar, 1988).

En ausencia de gestación la vida del cuerpo lúteo es muy corta, 8 a 9 días, al cabo de los cuales se inicia su regresión, reduciéndose su diámetro a la mitad a los 12 días del coito, al tiempo que desciende la secreción de progesterona, alcanzando su nivel más bajo en los días 14 ó 15 y cuando no existe gestación,

las hembras vuelven a mostrar receptividad sexual 12 a 14 días después de la última cópula (Fernández-Baca, 1970).

La actividad secretora del cuerpo lúteo de los camélidos puede determinarse a través de los niveles plasmáticos de progesterona o los niveles urinarios de glucuronato de pregnanodiol, ya que se ha comprobado que los cambios en las concentraciones de ambas sustancias son paralelos a las variaciones en el tamaño del cuerpo lúteo (England y Col., 1969).

Algunos autores señalan que la existencia de unos niveles plasmáticos de progesterona superiores a 0,32 ng/ml, indican de la existencia de un cuerpo lúteo funcional, mientras que otros establecen unos valores mínimos de 2 ng/ml. Se ha descrito la existencia de fases luteales cortas, con una duración de tan sólo 4 días, tanto en las llamas como en las alpacas (Sumar, 1988).

Los folículos en regresión pueden transformarse en folículos anovulatorios luteinizados, los cuales han perdido la capacidad de secretar los factores necesarios para que se produzca la ovulación. Pero la existencia de un cuerpo lúteo funcional no interrumpe las oleadas de crecimiento folicular, de manera que a los pocos días de la ovulación se forma un nuevo folículo dominante (Adams y Col., 1991).

La presencia de progesterona reduce el crecimiento folicular, de tal manera que el número de folículos que inician el crecimiento y el diámetro alcanzado por el folículo dominante son más reducidos (Aba y Col., 2005).

La regresión del cuerpo lúteo es consecuencia de la secreción endometrial de PGF2 α que llega a la circulación sistémica a través de las venas uterinas provocando la luteólisis en los camélidos. Un hecho curioso observado en los camélidos es que el cuerno uterino izquierdo tiene un efecto luteolítico local y sistémico, mientras que el efecto luteolítico del cuerno derecho solamente es local, por lo tanto, solo afecta al ovario derecho (Del Campo y Col., 1996).

1.9. Comportamiento sexual

Los camélidos domésticos, alpacas y llamas, al ser especies de ovulación inducida no presentan ciclos estrales definidos, por lo cual existen periodos de receptividad sexual que son bastante prolongados durante la época de apareamiento y en ausencia de machos pueden durar hasta los 36 días presentando breves interrupciones que no sobrepasan las 48 horas (San Martín y Col., 1968).

A medida que avanza la estación reproductiva, la intensidad del estro en las hembras receptivas se reducen y la receptividad sexual no está siempre asociada con la presencia de un folículo dominante, el comportamiento observado durante la etapa de receptividad sexual puede dividirse en cortejo y monta. La fase de cortejo se inicia cuando un macho sexualmente activo entra en contacto con una hembra, tiene una duración variable dependiendo de la libido y fortaleza del macho, oscilando entre unos segundos hasta los 10 min y

cesa cuando se produce la monta o el macho comprueba que es rechazado (England y Col., 1971).

Cuando la hembra está receptiva adopta una posición de decúbito esternal en presencia del macho o en las proximidades de una pareja que está copulando. Algunas hembras montan a otras que están echadas, ejecutando movimientos pélvicos similares a los machos pero dicho estímulo no es suficiente para inducir la ovulación (Novoa, 1970). Pero cuando una hembra no receptiva es perseguida por un macho, trata de escapar por todos los medios y se defiende pateando y escupiendo (Fernández-Baca y Novoa, 1968).

Durante la cópula el macho maniobra su pene alrededor de la vulva hasta ubicar la vagina, atraviesa el cérvix, con movimientos suaves hasta llegar a uno de los cuernos uterinos, para ir posteriormente cambiando sucesivamente de un cuerno a otro a lo largo de la eyaculación (Franco y Col., 1981). La duración media de la cópula suele ser de 20 a 30 minutos, aunque el rango es muy amplio variando entre 5 y 65 min. No existen signos externos indicativos del momento en que ocurre la eyaculación (Novoa, 1991).

1.10. Estacionalidad reproductiva

Existen opiniones contradictorias en relación a la existencia o no de estacionalidad reproductiva en los camélidos sudamericanos, lo que podría indicar que su patrón reproductivo está influido tanto por las condiciones ambientales, como por las de manejo a que son sometidos. En su habitad

natural tienen un comportamiento estacional de tal manera que los partos se producen entre enero y abril, esta época del año coincide con las condiciones ambientales que son más favorables por ser los meses más templados y lluviosos. Durante los cuales existe una mayor disponibilidad de pastos (Franklin, 1983).

En el hemisferio norte las llamas y alpacas se reproducen a lo largo de todo el año y en Nueva Zelanda se reproducen tanto en los meses de primavera, como durante el otoño. Aunque algunos estudios indican que la actividad sexual de los machos disminuye durante la primavera (Johnston, 1988).

La fisiología reproductiva de la alpaca está supeditada al manejo que reciben los animales. Así, en los rebaños de las comunidades campesinas en los que generalmente se mantienen los machos y las hembras agrupados a lo largo de todo el año, las alpacas paren únicamente entre los meses de enero y abril. En cambio cuando no hay asociación permanente entre hembras y machos, se los junta periódicamente y los apareamientos y la gestación ocurren en meses diferentes a los antes señalados (Pollard y Col., 1994).

El continuo agrupamiento de machos y hembras ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad sexual de los primeros, pudiendo ocasionar e incluso, la completa desaparición de la libido. Sin embargo; estos recuperan su actividad sexual de manera inmediata cuando son introducidos a un nuevo rebaño de hembras (Sumar y Adams, 1997).

Cuando existe completa separación de machos y hembras y solamente se permite la cópula de forma esporádica (por ejemplo una vez al mes) ambos sexos se mantienen sexualmente activos durante todo el año y los partos pueden producirse en cualquier época del mismo (Huanaco y Rodríguez, 1986).

Se desconoce los *mecanismos que regulan la estacionalidad sexual* de las hembras o la inhibición de la libido del macho como consecuencia del contacto continuo con hembras. Sin embargo, se considera que podrían intervenir algunos factores como la nutrición, la temperatura, la humedad y las horas de luz, así como estímulos visuales u olfativos, por su capacidad para influir en los centros nerviosos que controlan el comportamiento reproductivo (Brown, 2000).

1.11. Hormonas utilizadas para inducir superovulación en los camélidos

a. Hormona Liberadora de Gonadotropina (GnRH)

La hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es el neuropéptido clave que controla la función reproductiva en todas las especies de vertebrados. En hembras de ovulación inducida, la liberación preovulatoria de GnRH y el resultante surgimiento preovulatorio de LH, es inducido por el estímulo sensorial genital durante la monta (Novoa y Col., 1999).

La GnRH es sintetizado y luego almacenado en el hipotálamo medio basal. Proporciona un enlace humoral entre los sistemas neural y endocrino. En especies de ovulación espontánea, la liberación de GnRH es inducida por esteroides ováricos, los que estimulan secreción pulsátil de GnRH hacia la eminencia media y este se traduce en un estímulo para la secreción pulsátil

preovulatoria de LH. Pero en hembras de especies de ovulación inducida el patrón de liberación de GnRH es diferente, ya que el estradiol actúa en el cerebro para inducir aspectos de comportamiento sexual de proreceptividad y no directamente en la liberación de GnRH (Hafez, 2000).

b. Hormona Folículo Estimulante (FSH)

La FSH es una hormona glucoproteica, cuyo peso molecular es de 37,300 Daltons, compuesta por dos subunidades; una subunidad α que es estructuralmente similar a la LH y una subunidad β responsable de su actividad biológica específica. Tiene un componente característico de carbohidratos constituido por azúcares neutros, hexosaminas y un bajo contenido en ácido siálico. Este último aspecto provoca que su vida media sea muy corta, aproximadamente de 110 minutos, lo que obliga a realizar aplicaciones repetidas para conseguir una buena estimulación ovárica (Grimek y Col., 1979). Esta hormona es sintetizada por las células basófilas de la región central de la adenohipófisis y su principal función en la hembra es inducir el crecimiento folicular estimulando la proliferación de las células de la granulosa de folículos antrales, las cuales presentan receptores específicos para esta hormona (Monniaux y Col., 1983).

La FSH, por si sola, no estimula la secreción de estrógenos en el ovario, sino que para ello necesita de la presencia de LH, en las hembras de los camélidos los niveles basales de FSH han sido establecidos en valores próximos a los 5 ng/ml. Sin embargo, en algunas etapas del ciclo alcanza valores de 15-20 ng/ml

manteniéndose durante 5-6 días, promoviendo el crecimiento y la maduración del folículo ovárico o folículo de Graf (Hafez y Hafez, 2002).

c. Gonadotropina Coriónica Equina (eCG)

Esta hormona fue descubierta por Cole y Hart (1930), al comprobar que la administración de suero de yegua gestante a un grupo de ratas estimulaba el crecimiento folicular e incrementaba la tasa de ovulación, estableciendo así la base del tratamiento superovulatorio (González - Mencio y Col, 1978).

Esta hormona es una glucoproteína presente en grandes cantidades en el suero de yegua entre los días 46 y 130 de gestación y presenta en una misma molécula actividades biológicas propias de la FSH y de la LH (Papkoff, 1978). La molécula está compuesta por dos subunidades una α y otra β . La primera es la responsable de las actividades FSH y LH, mientras que la subunidad β determina la amplitud de su actividad. El alto contenido en ácido siálico de la molécula de eCG le confiere una larga vida media, que supera ampliamente a las de la FSH y la LH (Hafez y Hafez, 2002).

Existen diversos estudios en los que se ha comparado el efecto de ambas gonadotropinas (eCG y FSH) en la estimulación ovárica de los camélidos domésticos, obteniéndose resultados variables. Sin embargo; otros autores señalan que el tratamiento con FSH permite obtener mejores resultados que la eCG cuando se evalúan el número de folículos que crecen y el número de cuerpos lúteos formados tras la ovulación (Ratto, 2005).

El efecto de estas hormonas podría estar condicionado por la especie. Así, en un trabajo en el que se compara la respuesta de las alpacas y las llamas

sometidas a la estimulación ovárica con eCG, iniciando el tratamiento durante la emergencia de las ondas de crecimiento folicular, se comprueba que en las llamas se produjo el desarrollo de folículos y cuerpos lúteos en mayor número, mientras que en las alpacas fue menor (Huanca y Col., 2006).

La dosis de eCG más adecuada para conseguir la superovulación en las alpacas ha sido establecida entre 500 y 750 UI, seguida de 750 UI de hCG para inducir la ovulación. El empleo de dosis superiores determina un considerable incremento de la frecuencia de aparición de folículos quísticos (Novoa y Col., 1999).

d. Prostaglandina (PGF₂α)

Las prostaglandinas se aislaron primero de líquidos de glándulas sexuales accesorias y se denominaron prostaglandinas por su asociación con la próstata. Casi todos los tejidos corporales la secretan. Todas las prostaglandinas son ácidos grasos hidroxiiinsaturados de 20 carbonos con un ciclopentano, el ácido araquidónico es un ácido graso esencial, precursor de las prostaglandinas relacionadas más estrechamente con la reproducción, principalmente con la PGF₂α y prostaglandina E₂ (Hafez y Hafez, 2002).

La mayor parte de las prostaglandinas actúan localmente en su lugar de producción, y a diferencia de otros agentes hormonales, las prostaglandinas no se localizan en ningún tejido en particular, sino que son transportadas en la sangre para actuar en un tejido blanco, lejos del lugar de su producción (Hafez y Hafez, 2002).

La $\text{PGF2}\alpha$ es el agente luteolítico natural que finaliza la fase lútea (de cuerpo amarillo) del ciclo estral y permite el inicio de un nuevo ciclo estral en ausencia de fertilización. Esta es particularmente potente para finalizar la preñez temprana y se pueden considerar como hormonas que regulan varios fenómenos fisiológicos y farmacológicos, como la contracción del músculo liso en los aparatos gastrointestinal y reproductivo, erección, eyaculación, transporte de espermatozoides, ovulación, formación del cuerpo amarillo, el parto y la eyección de la leche (Hafez y Hafez, 2002).

El aumento del estrógeno, estimula la síntesis y liberación de $\text{PGF2}\alpha$. En animales preñados, el embrión en desarrollo manda una señal al útero (reconocimiento materno de la preñez), previniendo los efectos luteolíticos de la $\text{PGF2}\alpha$ y la capacidad de la misma para inducir luteólisis, ha sido aprovechada para manipular el ciclo estral e inducir el parto (Hafez y Hafez, 2002).

1.12. Inducción de la ovulación

Para inducir la ovulación en las alpacas y las llamas se recurre a la administración de hormonas con actividad de LH. La más comúnmente utilizada es la hGC (Gonadotropina Coriónica humana), a unas dosis que varían desde 10 a 1 600 U.I. Aunque son suficientes 750 UI de hCG para inducir ovulación en la mayor parte de los animales (Huanca y Col., 1999).

Existen algunos estudios en los que se ha comprobado que la administración de GnRH, es eficaz para provocar la liberación endógena de LH. Ahora para que la GnRH sea capaz de inducir la ovulación, es necesario utilizar concentraciones

superiores a los 1000 µg. Sin embargo; cuando se emplean análogos sintéticos de la GnRH como la buserelina, las dosis necesarias para inducir la ovulación son notablemente inferiores a 8 µg (Huanca y Huanca, 2003).

La ovulación se produce generalmente a las 26 h de la inyección de hCG y a las 28 h de la aplicación de GnRH, el folículo dominante deberá haber alcanzado un diámetro superior a los 7 mm y estar en fase de crecimiento (Adams y Col, 1992).

La estación del año influye significativamente en la respuesta a los productos administrados. Es así que durante el mes de enero se puede provocar la ovulación con dosis reducidas de hCG (250-500 UI), mientras que durante los meses de abril y mayo, es necesario emplear concentraciones superiores las 500 y 750 UI para conseguir ovulaciones entre el 90 y el 100% de los animales (Huanca y Col, 2000).

Se ha comprobado que cuando se deposita semen la porción anterior de la vagina, se produce la ovulación. Las inyecciones intramusculares con plasma seminal, también inducen la ovulación en llamas y alpacas (Chen y Col., 1985).

1.13. Superestimulación ovárica

La súper estimulación ovárica consiste en inducir el crecimiento, maduración y ovulación de un gran número de folículos de manera simultánea. Sin embargo, los camélidos presentan algunas diferencias fisiológicas respecto a otras especies domésticas que se ha de tener en cuenta al aplicar estos tratamientos, ya que son especies que no presentan fases luteales espontáneas y el folículo

dominante permanece activo durante períodos prolongados en las hembras no gestantes (Moor y Col., 1984).

Para que los tratamientos hormonales de estimulación ovárica consigan los objetivos marcados es necesario iniciarlos durante una fase lútea y en ausencia de un folículo dominante (Monniaux y Col., 1983). En un estudio realizado, se evaluó el efecto de la eCG durante la fase folicular y luteínica, comprobándose que la efectividad era mayor cuando se aplicaba en la segunda etapa del ciclo (Velásquez y Novoa, 1999).

Los tratamientos superovulatorios se basan en la administración de gonadotropinas (eCG y FSH), tras la sincronización de la oleada de crecimiento folicular durante una fase lútea natural (mediante la inducción de la ovulación con análogos de GnRH) o una fase lútea artificial (mediante la administración exógena de progesterona), (Huanca, 2008).

La estimulación hormonal del ovario incrementa el número de folículos reclutados al comienzo de cada oleada de crecimiento folicular. Sin embargo; cuando los folículos son reclutados mediante este procedimiento, su velocidad de crecimiento es mayor y la maduración de los ovocitos liberados muestra diversos grados de inmadurez nuclear o citoplasmática, que puede repercutir negativamente en la fecundación y en el desarrollo embrionario. Pero estos factores no han sido evaluados en los camélidos sudamericanos (Sirard y Col., 2000).

1.14. Superestimulación ovárica durante una fase lútea natural

La inducción de la ovulación del folículo dominante y la formación de un cuerpo lúteo se consigue mediante la administración de hCG o de análogos de la GnRH. (Huanca y Col, 2000).

En un estudio donde se administró una inyección intramuscular de 1 000 UI de eCG a los 7 días de la inducción de la ovulación. Posteriormente se provocó la lisis del cuerpo lúteo, mediante la administración de un análogo de la PGF2 α en el día 9, cuando los folículos alcanzaron un diámetro de 9 mm se inyectaron 750 IU de hCG para provocar la ovulación. El número de embriones obtenidos utilizando este tratamiento en llamas fue muy variable y se situaba en un rango comprendido entre 0 y 6 (Bourke y Col., 1995).

1.15. Superestimulación ovárica durante una fase lútea artificial

En alpacas, se ha comprobado que la administración de 1 000 UI de eCG al final de un tratamiento con CIDR produjo mayor respuesta ovárica, determinada en base al número de cuerpos lúteos, que el tratamiento en fase folicular (Velásquez y Novoa, 1999).

La utilización de implantes subcutáneos de norgestomet en llamas, durante un periodo de 7 días, combinada con una dosis de 1 000 UI de eCG en una única aplicación, administrada en el día 5, permite obtener una buena respuesta ovárica de 6 a 13 folículos. Sin embargo; el número de embriones recuperados fue bajo de 1 a 3 embriones por donante, rango de 0 a 4 (Bourke y Col; 1995).

La utilización de este mismo protocolo seguido de 500 UI de eCG o 50 mg de FSH (durante 4 días en dosis decrecientes) provocó el crecimiento de 05 folículos y permitió obtener 1 a 2 embriones por donante (Agüero y Col., 1999).

Los trabajos de investigación realizados demuestran que la inserción de un dispositivo intravaginal en cualquier etapa del ciclo inhibe el desarrollo folicular, lo que se pone de manifiesto por la ausencia de folículos con un diámetro superior a los 6 mm a los 5 días de la inserción del dispositivo (Cháves y Col., 2002).

Otro protocolo de tratamiento utilizado fue la administración de una inyección de benzoato de estradiol, seguida de la aplicación de un CIDR durante 8 días, al final de este periodo se administraron 1 200 UI de eCG obteniéndose respuesta ovárica en un 80% de las hembras tratadas. El número medio de folículos, cuerpos lúteos y embriones recuperados fue de 01, 02 y 04 respectivamente, considerando únicamente las hembras que respondieron al tratamiento (Aller y Col., 2002).

1.16. Superestimulación ovárica aplicada durante la fase de receptividad sexual

Los tratamientos de superestimulación ovárica se han llevado a cabo, también, en llamas y alpacas durante la fase folicular, iniciando la administración de hormonas cuando las hembras presentaban comportamiento de celo durante varios días consecutivos (Huanca y Col., 1999).

En llamas, se compararon los resultados obtenidos al administrar FSH (220 mg en dosis decrecientes) y eCG (500 UI), donde los mayores porcentajes de ovulación se obtuvieron en los animales tratados con FSH, con respecto a los animales tratados con eCG. Estos resultados demostraban que con la FSH, se puede lograr una respuesta ovárica satisfactoria en la inducción de la superovulación, durante el estro conductual (Correa y Col., 1997).

El incremento de la dosis de gonadotropinas produce mayor respuesta ovárica, pero no permite incrementar el número de embriones recuperados, lo que posiblemente se deba a la existencia de interferencias en el transporte de los gametos (Ratto y Col., 1999).

En un estudio realizado en alpacas, se aplicaron dos protocolos de tratamiento, iniciando ambos durante la etapa de receptividad sexual. El primero de ellos (T1) consistió en administrar 750 UI de hCG durante tres días, para inducir la ovulación. El segundo tratamiento (T2) consistió en administrar 300 UI eCG durante tres días. En ambos grupos se practicaron dos montas con machos fértiles. A los 7 días se evaluó la respuesta ovárica, pudiéndose observar que el número de cuerpos lúteos en ambos ovarios era mayor en el grupo T1, que en el T2 respectivamente. Por el contrario, el número de folículos con un diámetro superior a 10 mm fue inferior en el T1 que en el T2, de tal forma que el primero de los tratamientos permitió obtener una mejor respuesta ovulatoria (Huanca y Col., 2000).

Otro protocolo aplicado en alpacas durante la época de receptividad sexual consistió en administrar 250 UI de eCG y una pequeña dosis de FSH (dosis total 8,75 mg) en cantidades de decrecientes mediante inyección en la submucosa vulvar, obteniendo 04 embriones por hembra tratada (Palomino y Col., 1996).

La respuesta de las alpacas a un tratamiento superovulatorio aplicado durante el periodo del celo, es mayor cuando los animales han desarrollado un cuerpo lúteo en el ciclo anterior. Este hecho podría indicar que la progesterona endógena aumenta la sensibilidad del eje hipotálamo-hipofisario, favoreciendo la secreción de gonadotropinas (Leyva y García, 1999).

1.17. El Empadre

La monta ha sido definida en dos fases características, una primera de cortejo y posteriormente una fase de cópula. En la primera etapa el macho persigue e intenta montar a la hembra, esta maniobra es de corta duración, al ser aceptado el macho por una hembra receptiva se inicia la fase de cópula (Vivanco y Col., 1985).

La fase de cópula o apareamiento, se caracteriza por su brusquedad y violencia, pudiendo haber competencia entre machos de distinta edad, lo que se traduce en peleas continuas donde los vencedores inhiben la conducta sexual de los perdedores, lo que se traduce en una baja de la fertilidad del rebaño (Huanca y Col., 2001).

Durante la cópula las hembras demuestran una actitud calmada, siendo el macho quién demuestra su excitación. La hembra adopta una posición recumbente con sus miembros posteriores flectados y los anteriores extendidos, el macho se ubica por detrás de la hembra apoyando su porción esternal sobre el lomo de ésta, para luego depositar el semen intrauterinamente (Franco y Col., 1981).

El fenómeno de la cópula, dura varios minutos (18,4 en la alpaca y 24 minutos en la llama) tendiendo a ser más prolongada en invierno y más corta en verano (Englands y Col., 1971).

1.18. Lavado y recuperación de embriones

La recuperación de los embriones puede ser realizada por métodos quirúrgicos o no quirúrgicos. El primer trabajo en el que se describe la recolección de embriones de alpaca se efectuó a través de una laparotomía y el abordaje quirúrgico del oviducto (Cervantes, 2008).

En un trabajo en el que se realizó la recogida de embriones 3 días después de la inyección de 1000 UI hCG, se recuperaron 31 embriones de un total de 126 ovulaciones, dichos embriones se encontraban en el estadio de 2 a 8 blastómeros. Sin embargo, cuando la recogida se efectuó entre 7 y 8 días después de administrar 750 UI de hCG no fue posible recuperar ningún embrión. Estos datos podrían indicar que el desarrollo temprano de los embriones de alpaca es más rápido que en otras especies de rumiantes (Ratto y Col., 1999).

Posteriores estudios indican que la recuperación de embriones en estadio de blastocistos puede ser realizada a los 7 días post servicio y puede realizarse mediante técnica no quirúrgicas, similar a la descrita en vacunos (Del Campo y Col., 1997).

1.19. Clasificación de Embriones

Los embriones recuperados son evaluados y clasificados de acuerdo con los establecidos por la IETS (1998) en vacunos, para ello toma en cuenta los siguientes parámetros morfológicos: forma del embrión, color y textura del citoplasma celular, número y compactación de las células, variación del tamaño de las células, tamaño del espacio perivitelino, número y tamaño de las vesículas, presencia de blastómeros degeneradas y extraídas, apariencia de la zona pelúcida. Estableciéndose las siguientes categorías:

- **Embriones Excelentes**, se encuentran en uno de los estados de desarrollo esperados (blastocisto o blastocisto eclosionado), no muestran anomalías morfológicas aparentes, son esféricos y simétricos y sus células son uniformes en cuanto a color, tamaño y textura.
- **Embriones Buenos y Regulares**, se encuentran en uno de los estados de desarrollo esperados, presentan muy pocos defectos morfológicos como algún blastómero expulsado de la masa principal, forma ligeramente irregular o contienen alguna vesícula.

➤ **Embriones Malos**, se encuentran en uno de los estados de desarrollo esperado pero presentan defectos importantes, aunque no sean determinantes para su viabilidad posterior. Incluye aquellos embriones con numerosos blastómeros separados de la masa celular principal, presencia de núcleos picnóticos, etc., pero siempre con una masa celular aparentemente viable.

➤ **Embriones Degenerados y Retardados**, embriones con amplia degeneración celular y/o con un estado de desarrollo seriamente retardado, sin presentar una masa principal viable.

Apoyándose en esta clasificación y con el fin de simplificar la interpretación de los resultados, se han adaptado los criterios descritos por Stringgfellow y Seidel (1998), para evaluar la calidad de los embriones bovinos, utilizando la siguiente terminología:

➤ **Mórulas**, Los blastómeros individuales no se identifican. La masa celular del embrión ocupa la mayoría del espacio perivitelino.

➤ **Blastocistos excelentes**, Incluye aquellos blastocistos eclosionados que mostraban unos bordes bien delimitados y no presentaban defectos morfológicos.

➤ **Blastocistos Buenos**, Incluye aquellos blastocistos eclosionados que presentan bordes con ligeras irregularidades, que no son muy manifiestas.

➤ **Blastocistos Regulares**, Incluye aquellos blastocistos eclosionados cuyos bordes eran irregulares y aparecían arrugados.

➤ **Blastocistos Malos o degenerados**, Incluye aquellos blastocistos eclosionados con bordes muy irregulares y que contenían células picnóticas.

1.20. Influencia del tratamiento superovulatorio en la posterior fertilidad de la hembra donante

Las hembras donantes recuperan rápidamente la normalidad de su aparato genital, ya que la ecografía permite comprobar que el aspecto del útero es normal a las 3 semanas del lavado y con un único servicio se logró una tasa de gestación del 40 % (Huanca y Col., 2006).

En un estudio realizado con 10 alpacas de fertilidad comprobada sometidas a superovulación y posterior recuperación de embriones utilizando un procedimiento quirúrgico, se pudo comprobar que el 70% de los animales quedaron gestantes en un breve periodo. Estas observaciones nos permiten afirmar que el tratamiento superovulatorio, el manejo y el lavado uterino tienen escasa influencia en la fertilidad de las donantes (Franco y Col., 1999).

1.21. Influencia de la alimentación en la reproducción

Los pastos constituyen entre el 65 y 100% de la alimentación del ganado y la calidad del pasto afecta la reproducción del ganado que lo consume, un exceso o deficiencia de ambos componentes (energía y proteínas), se asocia a problemas reproductivos (García, 2010).

La edad al primer servicio está condicionada por la pubertad y el desarrollo corporal, que depende a su vez de la disponibilidad de recursos forrajeros. En régimen extensivo, las hembras reciben generalmente su primer servicio a los 2 años de edad, y en caso de que el desarrollo corporal sea deficiente se retrasa hasta los tres años. Sin embargo; cuando los animales se alimentan en praderas cultivadas se acelera la velocidad de crecimiento, por lo que es posible realizar el primer servicio a los 12 meses de edad (Larico, 1987).

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar de Estudio

El presente trabajo de investigación, se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología y Reproducción Asistida de la Estación Experimental Agraria Canaán – INIA., ubicado en el distrito de Ayacucho, Provincia de Huamanga, Región Ayacucho, a 2 730 m.s.n.m. Cuenta con una latitud sur de 13°10'09 y a 74°12'82 de longitud oeste, con una precipitación fluvial de 250 - 500 mm anual, una temperatura media de 18°C y pertenece a una zona Agroecológica de Sierra tropical media alta y cuenca hidrográfica de Yucaes (Anexo 01).

2.2. Duración del Trabajo

El presente trabajo tuvo un periodo de duración de 08 meses, desde la revisión de la bibliografía, hasta la sistematización de los datos.

2.3. Materiales

2.3.1. Materiales biológicos

➤ Animales

Se utilizaron 20 alpacas distribuidas en 02 grupos, 10 animales para someter al tratamiento con eCG y 10 con FSH, las hembras seleccionadas tuvieron edades comprendidas entre 3 - 6 años, con peso promedio de 60 y 70 kg, con condición corporal regular de 2.5 a 3 (escala de 1 a 5). Todas las hembras recibieron las mismas condiciones de manejo (ausencia de macho), fueron desparasitadas y alimentadas *ad libitum* bajo un sistema de pasturas naturales, adicionando suplementos vitamínicos por vía parenteral.

Se utilizaron 07 machos, con edades comprendidas entre 4-5 años, con un peso promedio de 80 a 90 kg. Todos los machos al igual que las hembras, recibieron las mismas condiciones de manejo.

➤ Embriones

Los embriones recolectados tras el tratamiento hormonal con FSH y eCG en las alpacas Huacaya, fueron clasificados en función a la calidad y grado adaptado para el estudio, según los criterios descritos por

Stringfellow y Seidel (1998), quienes evalúan a los embriones en cuatro calidades: excelente, bueno, regular y malo.

2.3.2. Material No Biológicos

Material de laboratorio

a) Medios de Lavado y Mantenimiento

- BSA (Suero Albúmina Bovina).
- PBS (Fosfato Búfer Salina).

b) Hormonas, Anestésicos y Tranquilizantes

- eCG (Gonadotropina Coriónica Equina): Folligon®.
- FSH (Hormona Folículo Estimulante): Folltropin® V.
- PGF₂α (Prostaglandina): Iliren®.
- Análogo de la GnRH (buserelina): Conceptal®
- Lidocaína al 2%.
- Promazil®.

c) Materiales de Lavado y Colección de embriones

- Catéter Foley doble vía de 18 x 65 cm.
- Fiador de acero inoxidable
- Filtros EM COM para colecta de embriones
- Matraz de vidrio de 1000 ml.
- Frascos Roux de 250 ml.
- Probeta de 1000 ml.
- Placas petri pequeña, mediana y grande

- Pipetas estériles de 5 y 10 ml.
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Jeringas desechables de 1, 5, 20 y 50 ml.
- Agujas hipodérmicas (N° 20,21 y 23)

d) Equipo

- Ecógrafo
- Estereomicroscópio, adecuado a una platina atemperada
- Baño María

Material de campo

- Sogas y lazos
- Carretilla de transporte
- Mamelucos
- Botas
- Gorro
- Fichas de control
- Marcadores
- Cuaderno de campo
- Lápiz, lapiceros y borrador

Otros materiales

- Termo con termómetro incorporado
- Gel ecográfico
- Guantes obstétricos

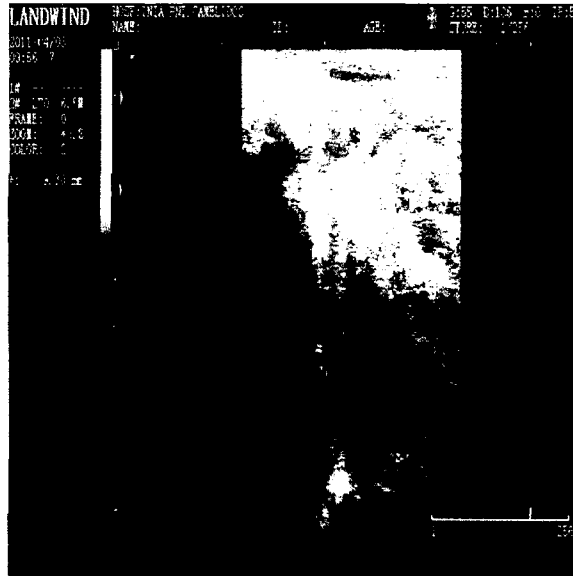
- Guantes quirúrgicos
- Papel toalla
- Alcohol y algodón

2.4. Etapas o Fases

2.4.1. Fase Pre – Experimental

- Las 20 alpacas hembras fueron seleccionadas en base a sus antecedentes de fertilidad, con antecedentes de haber tenido al menos una cría en la campaña anterior o que hayan parido en la presente campaña. En estas últimas se respetó un periodo mínimo de descanso postparto de 15 días (Anexo 02).
- exploración ecográfica de los animales, se realizó a través de un equipo LANDWIND 500 Modo B, equipado con un transductor lineal rectal, de 6.5 MHz, lo cual nos permitió comprobar la existencia de actividad ovárica y descartar la presencia de anomalías en su tracto reproductivo. Otro criterio utilizado para seleccionar los animales fue la posibilidad de introducir la mano del operador por vía rectal con posibilidades de manipular el tracto genital con comodidad.
- Para provocar una fase luteal inducida previa a la superovulación, los animales se agruparon en base a la presencia de folículos en crecimiento con un diámetro igual o superior a los 7 mm, y éstos fueron tratados con un 1ml de Conceptal® (equivalente a 4 ug de acetato de buserelina) con

la finalidad de inducir la ovulación y la posterior formación de un cuerpo lúteo funcional.



2.1. Evaluación ecográfica.

2.4.2. Fase Experimental

a. Tratamiento de superestimulación

Para el tratamiento de superovulación, las hembras seleccionadas fueron divididas al azar en dos grupos (Cuadro 2.1) y cada uno de ellos sometidos a diferentes tratamientos hormonales siguiendo los protocolos descritos en el Esquema 1 (Anexo 13).

Cuadro 2.1: Distribución de las hembras donantes en función al tratamiento hormonal.

GRUPO	HORMONAS	
	FSH	eCG
Total	10	10

Fuente: Elaboración propia

- Las hormonas utilizadas en los diferentes tratamientos fueron:
 - FSH (Folltropin® V), que fue administrada por vía intramuscular profunda en dosis decrecientes (40, 30, 18, 12 mg) a intervalos de 12 horas durante 4 días hasta alcanzar una dosis total de 200 mg por animal.
 - Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) (Folligon®), administrada por vía intramuscular profunda en una dosis única de 700 UI, equivalente a 3.5 ml por animal.
 - Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) (Conceptal®) en dosis de 4 ug por animal.
 - Prostaglandina (PGF2α) (Iliren®), inyectando 0,25 mg por animal (Anexo 03).
- Se realizó la exploración ecográfica del ovario, con la finalidad de verificar la presencia de folículos en crecimiento con un diámetro superior a los 7 mm.
- Los animales que cumplían dicha condición recibieron 4ug (1ml) de busrelina para inducir la ovulación y fueron explorados 2 días más

tarde para verificar la ovulación del folículo dominante, en cuyo caso se inició el tratamiento con las correspondientes hormonas (FSH o eCG) de acuerdo con la pauta de administración descrita en el Esquema 1 (Anexo 13).

- Al cabo de 7 días del inicio del tratamiento experimental se realizó una nueva evaluación ecográfica del ovario para cuantificar el número y características de los folículos y cuerpos lúteos (Anexo 04).
- Posteriormente se realizaron montas controladas junto con la administración de 4ug de buserelina para inducir la ovulación de los folículos que crecieron en respuesta a los tratamientos.



2.2. Realizando el empadre controlado.

b. Recuperación de los embriones

La recuperación de los embriones se realizó por un procedimiento no quirúrgico a los 7 días de efectuarse la monta, previa evaluación

ecográfica en todas las hembras que presentaban 1, 2 ó más cuerpos lúteos en sus ovarios.

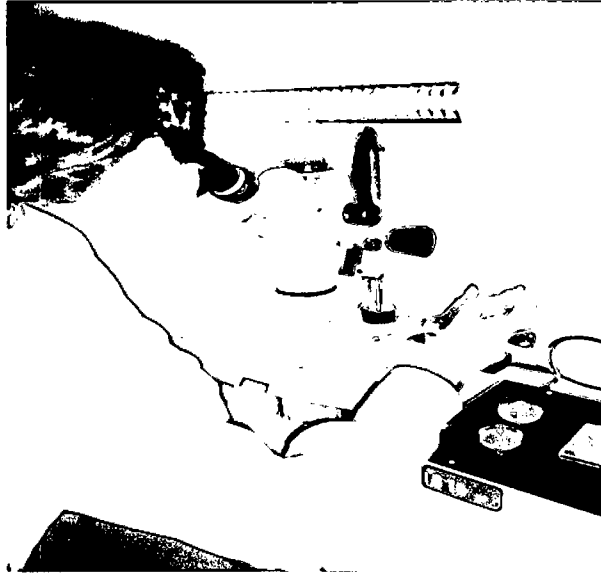
- Antes de iniciar la operación de lavado, se administró a cada animal 0,3 ml de Acepromacina (Promazil®) para su tranquilización y sujeción sobre una carreta con plataforma de madera diseñada para tal efecto (Anexo 05).
- Seguidamente, se aplicó 0.5 ml de clorhidrato de lidocaína al 2% (lidocaína) para conseguir la anestesia epidural baja. Finalmente se realizó la limpieza y desinfección de la región perineal (Anexo 06).
- Cada uno de los cuernos uterinos fue lavado por separado mediante un catéter de Foley de 18 mm de diámetro, al ser el que mejor se adaptaba a las dimensiones del tracto genital de la alpaca. Para facilitar la introducción del catéter a través de la cervix nos ayudamos de un fiador, que fue retirado parcialmente una vez alcanzado el correspondiente cuerno uterino (Anexo 07).
- Una vez situado el catéter en el tercio anterior de uno de los cuernos se procedió al inflado del balón con 15 cc de aire y finalmente se retiró el fiador.
- Para el lavado se utilizó un medio preparado estéril (Embryo. Colecction, Mediumf de Agetech), de capacidad de 1L. Cuya temperatura de mantenimiento y conservación es de 10-30 °C, previamente calentado a una temperatura de 37° C (Anexo 08).

- Cada uno de los cuernos fue lavado con 40 ml de medio inyectando cantidades variables con una jeringa de 50 ml.



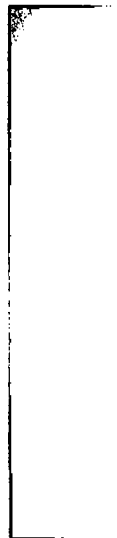
2.3. Lavado y recuperación de embriones.

- El medio de lavado fue filtrado a través de un filtro EM COM, de un diámetro de poro de 70 μm , para reducir su volumen hasta 20-30 cc y de esta manera facilitar su observación (Anexo 09).
- Una vez colectado el medio, se procedió a la búsqueda de los embriones a través del uso de un estereoscopio Motic®, a un aumento de 30X, para facilitar su búsqueda (Anexo 10).
- Los embriones recuperados fueron transferidos a un medio de mantenimiento (Biolife Holding & Transfer Medium) de capacidad de 60 ml. Cuya temperatura de conservación y refrigeración es de 2 - 5° C. Mantenido a una temperatura de 37°C para la conservación de los embriones.



2.4. Transfiriendo embriones al medio de mantenimiento.

- Todos los embriones recuperados fueron evaluados y clasificados de acuerdo con los establecidos por Stringgfellow y Seidel (1998), estableciéndose las siguientes categorías: Excelentes, buenos, regulares y malos.



2.5. Embrión de calidad excelente

- En esta categoría se incluyeron todas las estructuras recogidas durante la observación y búsqueda de embriones (Anexo 11).

c. Registro de Datos

Toda la información recogida en cada una de las etapas del trabajo experimental, fueron anotadas en una ficha individual para cada uno de los animales. Los datos recogidos en cada uno de las exploraciones ecográficas fueron desde el número y tamaño de folículos, cuerpos lúteos, número y calidad de embriones obtenidos, según corresponde a cada una de las categorías establecidas (Anexo 12).

2.6. Parámetros a Evaluar

2.6.1. Respuesta folicular, por Hembra

- Número promedio de folículos, según tratamiento hormonal.
- Tamaño promedio de folículos, según tratamiento hormonal.
- Tasa de ovulación, según tratamiento hormonal.

2.6.2. Respuesta lútea, por Hembra

- Número promedio de cuerpos lúteos, según tratamiento hormonal.
- Tamaño promedio de cuerpos lúteos, según tratamiento hormonal.

2.6.3. Respuesta embrionaria, por Hembra

- Número de embriones recuperados, según tratamiento hormonal.
- Tasa de recuperación de embriones, según tratamiento hormonal.

- Contingencia del tratamiento hormonal de la hembra, sobre el estado y calidad del embrión.

2.7. Diseño Estadístico

Para el análisis de los resultados, se empleó un diseño estadístico básico, donde se muestran *medidas de tendencia central (promedio)* y de dispersión (desviación estándar, error estándar, coeficiente de variabilidad, mínimo y máximo), asimismo se muestran frecuencias absolutas y relativas.

Para analizar las variables; número, tamaño de folículos y cuerpos lúteos, tasa de ovulación, número de embriones y tasa de recuperación de embriones se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) cuyo modelo aditivo lineal (MAL) fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = Es la variable respuesta (número y tamaño de folículos y cuerpos lúteos, tasa de ovulación, número de embriones y tasa de recuperación de embriones)

μ = Es el promedio general o constante común.

τ_i = Es el factor tratamiento hormonal (FSH y eCG).

ε_{ij} = Es el error experimental.

Las variables número de embriones previo al análisis fueron transformados a $(\sqrt{x+1})$.

Las variables tasa de ovulación y tasa de recuperación de embriones previo al análisis estadístico se transformó a valores angulares $\text{Sen}^{-1}\sqrt{y}$.

Para las comparaciones múltiples se utilizó la Prueba de Tukey-Kramer.

Para comparar si existe o no independencia entre variables cualitativas (Tratamiento hormonal, estado del embrión y calidad del embrión) se utilizó la prueba de independencia de chi-cuadrado, cuya fórmula es:

$$\chi_c^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(o_i - e_i)^2}{e_i} \approx \chi^2_{(k-1)}$$

Dónde:

o_i = es el número observado de casos en la categoría i ésima.

e_i = es el número esperado de casos en la categoría i ésima.

k =es el número de categorías.

Para la interpretación de las tablas de contingencia de 2x2 se ha utilizado la prueba de chi cuadrado con corrección por continuidad.

Los datos fueron procesados mediante los programas estadísticos SAS versión 9.2 (Sistema de Análisis Estadístico).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Evaluación de la respuesta folicular

Cuadro 3.1: Número promedio de folículos superestimados, según tratamiento hormonal en alpacas huacaya. E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011.

Hormona	N° de alpacas	Promedio ± Desviación estándar	C.V., %	Mínimo	Máximo
FSH	10	6.50 ± 2.76 ^b	42.44	2	11
eCG	10	10.20 ± 4.47 ^a	43.80	5	16

^{a,b} Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (P<0.05).

Prueba de Tukey-Kramer.

El cuadro 3.1, muestra el número promedio de folículos superestimados en alpacas Huacaya al tratamiento hormonal, obteniéndose con FSH 6.50 ± 2.76 folículos por hembra y 10.20 ± 4.47 folículos con eCG. Al análisis estadístico, sí existe diferencia estadística significativa (P<0.05) entre los tratamientos instaurados (Anexo 14).

Según los resultados obtenidos, el número promedio de folículos preovulatorios (≥ 7 mm) fue superior en las hembras tratadas con 700 UI de eCG, con respecto a hembras tratadas con 200 mg de FSH (dosis decrecientes por cuatro días) en un fase luteal natural inducida. Estos resultados son similares a lo obtenido por Huanca (2008) quien utilizando 750 UI de eCG obtuvo 9,74 folículos y 5,8 folículos con 200 mg de FSH en dosis decrecientes por cinco días. Como se evidencia los resultados, se utilizó 50 UI menos de eCG que Huanca (2008) y un día menos de estrés para el animal con la distribución del tratamiento con FSH.

Según Velásquez y Novoa (1999), se obtienen mejores resultados utilizando FSH cuando el tratamiento hormonal se administra durante una fase luteal inducida. En la mayoría de las especies domésticas los resultados obtenidos con FSH siempre superan a los logrados con eCG, aunque generalmente lo que se evalúa es el número de embriones transferibles como lo manifiestan Elsdén y col, (1978). No obstante, los resultados obtenidos por los diferentes autores al utilizar FSH resultan difícilmente comparables, debido a las grandes variaciones en la bioactividad del producto utilizado, ya que existe una gran variabilidad en cuanto a su contenido en LH como lo menciona Braileanu y col, (1998). No existe una opinión unánime respecto al efecto de la contaminación con LH sobre la respuesta ovárica.

Así, algunos autores como Yamamoto y col, (1993), señalan que cuanto mayor es la pureza del producto mayor es el número de ovulaciones y la calidad de los embriones, mientras que otros señalan que cuando la contaminación de LH es

en baja proporción se producen alteraciones en la maduración de los ovocitos, en la fecundación y el desarrollo embrionario como lo reporta Herrler y col, (1991). Tampoco se descarta, que la variada respuesta obtenida en los animales tratados con FSH sean consecuencia del estrés provocado por el manejo de los animales, ya que es necesario repetidas administraciones del producto. Así, en un estudio realizado por Bo y col, (1994) utilizando novillas, demostraron que una única inyección subcutánea de FSH permitía obtener mejores respuestas que la administración del preparado 2 veces al día durante cuatro días consecutivos.

Cuadro 3.2: Tamaño promedio de folículos (mm), según tratamiento hormonal en alpacas huacaya. E.E.A. CANAAN – INIA. Ayacucho, 2011.

Hormona	N° de alpacas	Promedio ± Error estándar	C.V., %	Mínimo	Máximo
FSH	10	7.57 ± 0.22 ^b	9.28	6.5	8.67
eCG	10	8.75 ± 0.51 ^a	18.33	6.5	11.67

^{a,b} Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (P<0.05).

Prueba de Tukey-Kramer

El cuadro 3.2, muestra el tamaño promedio de folículos superestimulados para alpacas asignadas al tratamiento hormonal, lográndose 7.57 ± 0.22 mm con FSH y 8.75 ± 0.51mm con eCG. Al análisis estadístico, sí existe diferencia significativa (P<0.05) entre el tamaño promedio de folículos de ambos tratamientos hormonales (Anexo 15).

Según los resultados obtenidos, se observa que la hormona utilizada determina la existencia de diferencias en el diámetro medio de los folículos incluidos en la

categoría de 7 a 13 mm. Así, en las hembras tratadas con eCG el diámetro medio de dichos folículos fue superior al de las hembras tratadas con FSH, estos resultados son casi similares a los reportados por Huanca (2008) quien obtuvo folículos de 9,01mm con eCG frente a 8,31mm de tamaño con FSH. No existe ningún trabajo previo que analice la influencia del tamaño folicular con el tratamiento hormonal. Esta variación podría indicar que la velocidad de crecimiento de los folículos reclutados como respuesta al tratamiento con FSH es menor y por ello tardarían más tiempo en adquirir la capacidad de responder a la descarga preovulatoria de LH.

En los animales tratados con eCG el número de folículos con diámetro inferior a 7 mm es significativamente inferior al de los que recibieron FSH. Los resultados obtenidos por Driancourt y Fry (1992), al evaluar el crecimiento y la maduración de los folículos de ovejas tratadas con FSH y eCG, demostraron que la eCG determinaba una mayor velocidad de crecimiento folicular y mayor producción de estradiol. A partir del momento en el que se establece la selección, el crecimiento folicular está regulado por la LH, por lo que el menor tamaño de los folículos presentes en el ovario de las hembras tratadas con FSH podría ser consecuencia de la necesidad de competir por la LH presente en el torrente circulatorio.

Así, algunos estudios previos demuestran que el diámetro de los folículos dominantes que crecen como respuesta de un tratamiento superovulatorio con FSH es inferior al alcanzado por el folículo dominante que se forma durante una oleada de crecimiento natural como lo afirma Adams y col (1992).

Cuadro 3.3: Tasa de ovulación, según tratamiento hormonal en alpacas huacaya. E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011.

Hormona	N° de alpacas	Promedio ± Desviación estándar	C.V., %	Mínimo	Máximo
FSH	10	41.36 ± 37.77 ^a	91.30	0	100
eCG	10	65.76 ± 40.07 ^b	60.92	0	108.33

^{a,b} Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa. (P<0.05). Prueba de Tukey-Kramer

El cuadro 3.3, muestra la tasa de ovulación de folículos superestimulados en alpacas huacaya, en la cual el tratamiento hormonal con FSH el promedio fue de 41.36 ± 37.77% y con eCG 65.76 ± 40.07%. Al análisis estadístico previa transformación de los datos (arco seno) si existe diferencia significativa (P<0.05) entre los promedios de ambos tratamientos hormonales (Anexo 16).

Según los resultados obtenidos, podemos resaltar que el porcentaje de ovulaciones en hembras tratadas con eCG fue superior a las hembras tratadas con FSH al administrar GnRH post cópula. Haciendo una comparación con otros trabajos en llamas, utilizándose plasma seminal (1.5ml) por vía I.M como factor inductor de la ovulación, obtuvieron 93.8 % (16/91) de ovulaciones. Estos resultados fueron casi similares a los obtenidos por Adams y Ratto (2001) en alpacas y Vásquez y col (2007) en llamas, pero superiores a los obtenidos por Ciprián (2000) en alpacas y llamas. No existen datos bibliográficos con respecto a la influencia de la dosis utilizada en los diferentes tratamientos hormonales sobre la respuesta ovulatoria en alpacas, después de aplicar GnRH post cópula.

Algunos autores como Kanitz y Col. (2002) demostraron que en otras especies animales, incrementándose la dosis de FSH, provocaron una reducción del porcentaje de ovulaciones. Según los resultados obtenidos, se podría indicar que la velocidad de crecimiento de los folículos reclutados como respuesta al tratamiento con FSH es menor y por ello, tardarían más tiempo en adquirir la capacidad de responder a la descarga preovulatoria de LH. Otros autores como Correa y col, (1997) indican que la utilización de eCG para estimular la actividad ovárica interfiere con la ovulación, debido a que su larga vida media provocaría la luteinización de los folículos.

3.2. Evaluación de la respuesta luteal

Cuadro 3.4: Número promedio de cuerpos lúteos, según tratamiento hormonal en alpacas huacaya. E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011.

Hormona	Nº de alpacas	Promedio \pm Desviación estándar	C.V., %	Mínimo	Máximo
FSH	8	3.75 \pm 2.55 ^b	67.99	1	7
eCG	8	8.00 \pm 3.42 ^a	42.78	2	13

^{a,b} Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (P<0.05). Prueba de Tukey-Kramer.

El cuadro 3.4, muestra el número promedio de cuerpos lúteos formados post tratamiento hormonal en alpacas huacaya, lográndose 3.75 \pm 2.55 cuerpos lúteos con la FSH y 8.00 \pm 3.42 cuerpos lúteos con eCG. Al análisis estadístico, sí existe diferencia significativa (P<0.05) entre el número promedio de cuerpos lúteos para ambos tratamientos hormonales (Anexo 17).

Según los resultados obtenidos, el número de cuerpos lúteos en hembras tratadas con eCG fue superior con respecto a la FSH, pero inferiores a los obtenidos por Huanca (2008), donde obtuvo 10.60 ± 0.50 (15/45) cuerpos lúteos con eCG y 9.50 ± 0.90 (12/45) con FSH.

La información existente en alpacas es muy escasa; sin embargo, Velásquez y Novoa (1999) señalan que el número de cuerpos lúteos fue mayor en las hembras que recibieron la eCG (17.8) durante una fase luteal artificial frente a los animales que recibieron la gonadotropina durante una fase folicular (8,20). Al analizar la influencia de la situación fisiológica de las donantes, las hormonas utilizadas y la interacción entre ambas sobre el número de cuerpos lúteos, se observó que únicamente la hormona ejercía un efecto estadísticamente significativo, siendo el número de cuerpos lúteos superior en las hembras tratadas con eCG. Estos resultados son contrarios a los obtenidos en llamas por Correa y col (1997), quienes observaron un mayor número de cuerpos lúteos en los animales tratados con FSH, a pesar de que las hembras tratadas con eCG presentaban un mayor número de folículos preovulatorios. Estos autores indican que la utilización de eCG para estimular la actividad ovárica interfiere con la ovulación, debido a que su larga vida media que provocaría la luteinización de los folículos. Las diferencias observadas con nuestros resultados podrían ser consecuencia de la mayor efectividad del procedimiento empleado para inducir la ovulación (monta más administración de GnRH).

Autores como Adams y col. (1992) demuestran que la administración de GnRH en el momento de la monta incrementa el porcentaje de ovulaciones y reduce el

periodo necesario para que se complete la ovulación, cuando en el ovario existen múltiples folículos.

Cuadro 3.5: Tamaño promedio de cuerpos lúteos, según tratamiento hormonal en alpacas huacaya. E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011.

Hormona	N° de alpacas	Promedio \pm Error estándar	C.V.,%	Mínimo	Máximo
FSH	8	11.37 \pm 0.54 ^a	13.55	10	14.5
eCG	8	12.57 \pm 0.67 ^a	15.02	10	15.67

^{a,a} Literales iguales en la misma columna, indican que no existe diferencia estadística significativa ($P \geq 0.05$). Prueba de Tukey-Kramer.

El cuadro 3.5, muestra el tamaño promedio de cuerpos lúteos en alpacas asignadas al *tratamiento hormonal*, lográndose 11.37 \pm 0.54 mm con FSH y 12.57 \pm 0.67mm con eCG. Al análisis estadístico, no existe diferencia significativa ($P \geq 0.05$) del tamaño luteal entre ambos tratamientos hormonales (Anexo 18).

Según los resultados obtenidos, con ambos tratamientos se logra tamaños apropiados de cuerpos lúteos que pueden garantizar una gestación apropiada, debido a que esta estructura estaría en crecimiento y por ende mayor producción de progesterona tal como lo afirman Hafez y Hafez (2002).

Haciendo una comparación a los resultados obtenidos por Vásquez (2005), fueron casi similares quien utilizando plasma seminal entero, obtuvo cuerpos lúteos con diámetro de 10.9 \pm 2.7mm; así mismo, en otro estudio realizado por

Panez (2007), obtuvo cuerpos lúteos con un diámetro de 9.5 ± 1.10 mm (10/15); al utilizar plasma seminal por vía intramuscular. Coincidimos también con Sumar (1988), quien reportó que el cuerpo lúteo crece rápidamente de 7 mm de diámetro el día 3 post monta y de 10-12 mm en el día 7 a 8 después del servicio.

3.3. Evaluación de la respuesta embrionaria

Cuadro 3.6: Número de embriones recuperados post superestimulación ovárica, según tratamiento hormonal en alpacas huacaya. E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011

Hormona	N° de alpacas		Promedio \pm Desviación estándar	C.V.,%	Mínimo	Máximo
	Total	Donadoras				
FSH	10	8	2.50 ± 2.51^a	100.29	1	7
eCG	10	6	3.00 ± 1.55^a	51.64	1	5

^{a,a} Literales iguales en la misma columna, indican que no existe diferencia estadística significativa ($P \geq 0.05$).

Prueba de Tukey-Kramer.

El cuadro 3.6, muestra el número promedio de embriones recuperados post superestimulación ovárica según tratamiento hormonal, obteniéndose 2.50 ± 2.51 embriones por alpaca con FSH y 3.00 ± 1.55 embriones con eCG. Al análisis estadístico, no existe diferencia significativa ($P \geq 0.05$) entre el número promedio de embriones recuperados para ambos tratamientos hormonales (Anexo 19). La respuesta ovárica es casi homogénea en ambos grupos. No obstante, en las donantes tratadas con FSH en las que no se recuperó ningún embrión (02/10) se apreció un mayor número de folículos < 7 mm. Mientras que

en las tratadas con eCG (04/10), en las que no se obtuvo ningún embrión, se evidencio una mayor presencia de folículos con un diámetro de 7 a 13 mm. Estos datos parecen indicar nuevamente que el protocolo de administración de la FSH o la dosis utilizada no permite incrementar la velocidad de crecimiento folicular de manera adecuada en esta especie, de tal forma que una parte importante de los folículos no habrían alcanzado el diámetro mínimo necesario para responder a la descarga preovulatoria de LH, repercutiendo negativamente en la producción de embriones. La ausencia de una estrecha correspondencia entre la respuesta ovárica y la producción de embriones podría estar indicando la interferencia de la superovulación con la maduración de los ovocitos, la ovulación o el transporte de los gametos o de los embriones.

Algunos autores como Sirad y col, (2000) han señalado que la superovulación afecta a la maduración nuclear y citoplásmica de los ovocitos disminuyendo su capacidad para ser fecundados y soportar el posterior desarrollo embrionario. Pero estos efectos no han sido estudiados aún en los camélidos sudamericanos y tampoco podemos descartar la influencia del momento en el que realizamos el lavado y la destreza del operador en el número de embriones obtenidos.

Cuadro 3.7: Tasa de recuperación de embriones post superestimulación ovárica, según tratamiento hormonal en alpacas huacaya. E.E.A. CANAAN-INIA. Ayacucho, 2011.

Hormona	N° de Alpacas donadoras	Promedio \pm Desviación estándar	C.V., %	Mínimo	Máximo
FSH	8.00	83.75 \pm 60.56 ^a	72.32	16.67	200
eCG	6.00	27.72 \pm 26.89 ^b	97.02	0	83.33

^{a,b} Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$). Prueba de Tukey-Kramer

El cuadro 3.7, muestra la tasa de recuperación de embriones para las alpacas, que para el tratamiento hormonal con FSH fue de $83.75 \pm 60.56\%$ y para el grupo con eCG de $27.72 \pm 26.89\%$. Al análisis estadístico previa transformación de datos (arco seno) sí existe diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los promedios de los dos tratamientos hormonales (Anexo 20).

Según los resultados obtenidos, el porcentaje de embriones obtenidos fue superior en el grupo de hembras tratadas con FSH con respecto a la eCG, esta diferencia significativa podría indicar que es consecuencia de que en estos animales haya existido un retraso en la ovulación y por lo tanto en la migración del embrión del oviducto hacia el útero, pudiendo producirse entre los días 8 y 9 como lo observaron Taylor y col, (2001) en hembras no superovuladas.

Además, se obtuvo un total de 38 embriones como resultado de alpacas sometidas a ambos tratamientos hormonales. Lo que representa un porcentaje

de recuperación en 70% (14/20) de las hembras donantes. Nuestros resultados son superiores a los descritos por Correa y col, (1997) 46,7% (21/45), a los indicados por Ratto y col, (1999) 31% (14/45) pero inferiores a los de Aller y col, (2002) 86,6% (13/15). Es necesario señalar que todos estos investigadores han desarrollado sus experimentos en llamas y que no existen datos bibliográficos referentes a alpacas. Además, se observó la existencia de una gran variabilidad individual entre donantes, ya que el número de embriones obtenidos oscilaba en un rango de 1 a 7 embriones/donante, situación que coincide con lo descrito previamente por otros autores como Bourke y col, (1992), Correa y col, (1997). El porcentaje de embriones recuperados está condicionado por diversos factores entre los que se ha destacado, por su importancia, la incapacidad de la fimbria oviductal para captar todos los ovocitos liberados, el día en el que se efectúa la recogida, como lo reporta Taylor y col., (2001) y el procedimiento utilizado para el lavado del útero, como lo refiere Ratto y col., (1999), Huanca y col. (2006).

Cuadro 3.8: Contingencia del tratamiento hormonal de la hembra, sobre el estado del embrión en alpacas huacaya. E.E.A. CANAAN-INIA. Ayacucho, 2011.

Tratamiento Hormonal	Embrión				Total	%
	Blastocisto	%	Mórula	%		
eCG	16	88.9	2	11.1	18	100.00
FSH	19	95.0	1	5.0	20	100.00
Total	35	92.1	3	7.9	38	100.00

El cuadro 3.8, muestra la tabla de contingencia del tratamiento hormonal de la hembra sobre el estado del embrión en alpacas huacaya; obteniéndose para el tratamiento hormonal con eCG el 88.9% (16/38) de los embriones en estado de blastocisto y el 11.1% (2/38) mórula. Para el tratamiento con FSH el 95% (19/38) fueron en estado blastocisto y 5% (1/38) mórula. Al análisis estadístico con la prueba de chi – cuadrado, con corrección por continuidad, nos indica que el estado del embrión es independiente ($P \geq 0.05$) del tratamiento hormonal (Anexo 21).

Se ha recuperado un total de 35 blastocistos (92.1%) y 3 mórulas (7.9%). En la mayor parte de los animales se obtuvieron únicamente blastocistos, aunque algunas hembras produjeron mórulas y blastocistos y otras solamente mórulas. En ningún caso se recuperó ovocitos sin fecundar, lo que podría indicar que en los camélidos el porcentaje de fecundación es muy elevado, como lo afirman Correa y col (1997), o bien la existencia de algún mecanismo que impide su migración desde el oviducto al útero.

Algunos autores como Novoa y col, (1999), han señalado la existencia de un mecanismo de selección, localizado en la unión útero-tubárica, que solamente permite el paso de los embriones que han alcanzado un desarrollo adecuado tal y como sucede en la yegua, reportado por Betteridge y Mitchell, (1974).

Los datos existentes en la bibliografía con respecto a las características de los embriones son diversos; así, otros autores como Palomino y col, (1996), señalan la presencia de mórulas y blastocistos expandidos, mientras que Aller y col, (2002) únicamente encuentran blastocistos eclosionados. La presencia de

mórulas en el útero contradice las afirmaciones de Bourke y col (1992), quienes señalan que únicamente es posible obtener mórulas mediante el lavado del oviducto a los 3 días de producirse la ovulación.

Los porcentajes de blastocistos obtenidos de hembras tratadas con FSH (95,0%) y con eCG (88,9%) fueron muy similares los que difieren con lo señalado por Ratto y col, (1999) quienes observaron que en llamas la FSH permite obtener un mayor número de blastocistos cuando se administra en dosis decrecientes durante 5 días consecutivos en el transcurso de una fase luteal inducida. Haciendo una comparación con otro trabajo realizado en alpacas, nuestros resultados son superiores a los indicados por Huanca (2008), quien obtuvo 41.66% (15/36) de blastocistos con FSH y 58.33% (21/36) con eCG.

Cuadro 3.9: Contingencia del tratamiento hormonal de la hembra, sobre la calidad del embrión en alpacas huacaya. E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011.

Hormona	Calidad embrionaria									
	Excelente	%	Bueno	%	Regular	%	Malo	%	Total	%
FSH	8	40.0	4	20.0	3	15.0	5	25.0	20	100.00
eCG	8	44.0	3	16.7	1	5.6	6	33.3	18	100.00
Total	16	42.1	7	18.4	4	10.5	11	28.9	38	100.00

El cuadro 3.9, muestra la tabla de contingencia del tratamiento hormonal de la hembra sobre la calidad del embrión en alpacas huacaya, en donde se evidencia, que para el tratamiento hormonal con eCG, el 44.4% (8/38) de los embriones fueron de calidad excelente, el 16.7% (3/38) de calidad bueno, el 5.6% (1/38) regular y el 33.3% (6/38) malo. En tanto para el tratamiento

hormonal con FSH el 40% (8/38) de los embriones fueron de calidad excelente, el 20% (4/38) fue bueno, 15% (3/38) regular, y el 25% (5/38) malo. Al análisis estadístico de la prueba de chi - cuadrado nos indica que la calidad del embrión es independiente ($P \geq 0.05$) del tratamiento hormonal (Anexo 22).

Al evaluar la calidad de embriones recuperados se observó que la utilización de la FSH permitió obtener un número de embriones catalogados como excelentes similares al de la eCG; pero la FSH permitió obtener un mayor número de embriones incluidos dentro de la categoría de buenos. Esta observación coincide con lo descrito por Monniaux y col, (1983) en otras especies, indicando que los embriones producidos por las hembras tratadas con FSH son de calidad superior o transferibles. Algunos estudios endocrinos han demostrado que en las vacas tratadas con eCG, son más frecuentes los perfiles anormales de LH y progesterona, lo que se ha asociado con una reducción en los porcentajes de ovulación y fecundación, según lo reportado por Callesen y col, (1986).

Trabajos realizados en camélidos por Aller y col, (2002); Ratto y col, (1999) sólo consideran el efecto de la situación ovárica en el momento de la recogida sobre la producción de embriones. Debido a que algunas de las hembras tratadas presentaban folículos anovulatorios en el momento del lavado del útero. Sin embargo, nuestros resultados indican que su presencia no afecta al número de embriones obtenidos, ni a la calidad de los mismos.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

1. La aplicación de ambos protocolos de superovulación, permitió obtener mayor número de embriones viables en alpacas huacaya.
2. La respuesta ovárica en alpacas huacaya sometidas a diferentes tratamientos hormonales de superestimulación (eCG y FSH) mostraron diferencias estadísticas significativas en cuanto al número y tamaño de folículos, número de cuerpos lúteos y la tasa de ovulación. No se evidenció diferencia estadística significativa para el tamaño de cuerpos lúteos.
3. Los embriones recuperados en alpacas Huacaya como resultado de la superestimulación ovárica con tratamientos hormonales (eCG y FSH) no mostró diferencia estadística significativa para el número de embriones. Si se evidencio diferencia estadística significativa para la tasa de recuperación embrionaria.

4. El estado y la calidad del embrión en alpacas huacaya como resultado de la superovulación hormonal (FSH, eCG), es independiente del tratamiento hormonal para ambas condiciones.

5. La utilización de las alpacas hembras como donantes de embriones no afectó a la posterior recuperación de su actividad ovárica, ni a su capacidad para iniciar una nueva gestación.

4.2. RECOMENDACIONES

1. Realizar trabajos similares y continuar con la presente investigación, con el objetivo de evaluar nuevos protocolos de superovulación, utilizando diferentes dosis hormonales, en mayor número de muestra, condición de los animales (lactantes y no lactantes) e incluso considerando a la raza Suri y otras especies silvestres de importancia económica como la vicuña.

2. Ejecutar estudios sobre la cantidad de embriones que son posibles recuperar de una misma donadora en un año, como resultado del tratamiento hormonal y comprobar su viabilidad realizando la transferencia de los mismos a la población de hembras receptoras de esta especie.

3. Fomentar el desarrollo de biotecnologías reproductivas en alpacas a nivel de la Región, a través de instituciones públicas y privadas comprometidas en el desarrollo pecuario, para mejorar la calidad de la fibra y así incrementar el ingreso económico y calidad de vida del productor alpaquero.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Reproducción Asistida de la Estación Experimental Canaán INIA – Ayacucho, Provincia de Huamanga, Región Ayacucho a 2730 m.s.n.m con el objetivo de evaluar la respuesta ovárica a superestimulación expresada en número y el tamaño de folículos y cuerpos lúteos, tasa de ovulaciones, número y tasa de embriones recuperados, condición y calidad del embrión después de la administración de FSH y eCG. Se utilizó 20 alpacas adultas empleando el DCA (Diseño Completamente al Azar) simple. Para comparar si existe o no independencia entre el tratamiento hormonal sobre el estado y calidad del embrión se utilizó la prueba de chi- cuadrado. La respuesta folicular en alpacas fue 6.50 ± 2.76 folículos /animal, con un diámetro de 7.57 ± 0.22 mm para FSH y 10.20 ± 4.47 folículos /animal con un diámetro de 8.75 ± 0.51 mm con eCG, existiendo diferencia ($P < 0.05$) entre ambas hormonas. El número promedio de cuerpos lúteos con FSH fue 3.75 ± 2.55 CL/animal y para la eCG se obtiene 8.00 ± 3.42 CL/ existiendo diferencia estadística ($P < 0.05$) para ambos tratamientos hormonales. El tamaño de CL fue de 11.37 ± 0.54 mm con FSH y 12.57 ± 0.67 mm para eCG, no existiendo diferencia ($P \geq 0.05$) entre ambas hormonas. Se obtuvo una tasa de ovulación de 41.36% /animal con FSH y 65.76% /animal con eCG, existiendo ($P < 0.05$) diferencia estadística para ambas hormonas. El número de embriones recuperados con FSH fue de 2.50 ± 2.51 embriones/animal y con eCG 3.00 ± 1.55 embriones /animal, no existiendo diferencia estadística ($P \geq 0.05$) para ambas hormonas. La tasa de recuperación

embrionaria con FSH fue 83.75%/animal y 27.72%/animal con eCG, existiendo diferencia estadística ($P < 0.05$) con ambos tratamientos hormonales. En el tratamiento hormonal sobre el estado de embrión, se obtuvo 95 % blastocistos y 5 % mórulas con FSH y 88.9 % blastocistos y 11.1 % mórulas con eCG. El estado del embrión es independiente ($P \geq 0.05$) del tratamiento hormonal. A la evaluación del tratamiento hormonal sobre la calidad de los embriones, el 40 % (8/38) fue de calidad excelente, 20 % (4/38) buenos, 15 % (3/38) regulares, 25 % (5/38) malos con FSH y el 44.4 % (8/38) excelente, 16.7 % (3/38) buenos, 5.6 % (1/38) regulares y 33.3 % (6/38) malos con eCG. La calidad del embrión es independiente ($P \geq 0.05$) del tratamiento hormonal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aba, M. 1995. Studies on the reproductive endocrinology of llamas and alpacas from mating throughout early pregnancy. Master Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.11-78.
2. Aba, M; Miragaya, M; Capdevielle, E; Rutter, B; Agüero, A. 2005. Effect of exogenous progesterone and eCG treatment on follicular dynamics in vicuñas (*Vicugna vicugna*). *Animal Reproduction Science*. 86, 153-161.
3. Adams, G; Griffin, G; Ginther, O.1989: In situ morphologic dynamics of ovaries, uterus and cervix in llamas. *Biology of Reproduction*.551-558.
4. Adams, G; Sumar, J; Ginther, O. 1990. Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 535.
5. Adams, G; Sumar, J; Ginther, O. 1991. Form and function of the corpus luteum in llamas. *Animal Reproduction Science*. 24, 127-138 pp.
6. Adams, G; Matteri, R; Kastelic, J; Ko, J; Ginther, O. 1992: Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*. 94, 177-188.
7. Adams, G; Ratto, M. 2001. Reproductive biotechnology in South American Camelids. *Revista de Investigaciones Veterinarias*. Perú. Suplemento 1. 134 -141.

8. Agüero, A; Chaves, M; Capdevielle, E; Russo, A .1999. Superovulación en llamas: comparación de dos tratamientos. II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco-Perú. 94.
9. Alvarado, E. 2003. Avances en la biotecnología de la reproducción animal. En Resúmenes de la XXVI Reunión científica anual peruana de producción animal. Pucallpa – Perú.
10. Alberio, R; Aller, J.1996. Control y sincronización de la onda folicular mediante la aplicación de progesterona exógena en llamas. Revista Argentina de Producción Animal. 325-329.
11. Aller, J; Rebuffi, G; Cancino, A. 2002. Superovulación response to progestogen - eCG treatment in vicugna (*Vicugna vicugna*) in semicaptive conditions. *Theriogenology*. 57, 576.
12. Betteridge, K; Mitchell, D. 1974. Direct evidence of retention of unfertilized ova in the oviduct of the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*. 39, 145–148.
13. Bhat, K; Mahesh, B; Ping, I; Chorich, I; Weidmeier, V; Brann, D.1998. Opioid-Glutamate-Nitric Oxide Connection in the regulation of Luteinizing Hormone Secretion in the Rat. *Endocrinology*. 139(3), 955-960.
14. Bo, G; Caccia, M; Martínez, M; Adams, G; Pierson, R; Mapeltoft, R. 1994. The use of estradiol and progestogen treatment for the control of follicular wave dynamics in beef cattle. *Theriogenology*. 40,165.

15. Bourke, D; Adam, C; Kyle, C; Young, P; Mc Evoy, T. 1992. Ovulation, superovulation and embryo recovery in llamas. Congress on Animal Reproduction. Vol 1 The Hague, 23-27 August. 193-195.
16. Bourke, D; Kyle, C; Mc Evoy, T; Young, O; Adam, C. 1995. Superovulatory responses to eCG in llamas (*Lama glama*). Theriogenology. 44, 255-268.
17. Braileanu, G; Albanese, C; Card, C; Chedrese, P. 1998. FSH bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. Theriogenology. 49, 1031-1037.
18. Bravo, W; Fowler, M; Stabenfeldt, G; Lasley, B. 1990. Ovarian follicular dynamics in the llama. Biology Reproduction. 43, 579-585.
19. Bravo, W; Stabenfeldt, G; Lasley, B; Fowler, M. 1991. The effect of ovarian follicular size on pituitary and ovarian responses to copulation in domesticated South American camelids. Biología de la Reproducción. 45, 553-559.
20. Brown, B. 2000. A review on reproduction in South American camelids. Animal Reproduction Science. 58, 169-195.
21. Callesen, H; Greve, T; Hyttel, P. 1986. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. Theriogenology. 25, 71-86.
22. Cervantes, M. 2008. Momento óptimo post copula para la recuperación de embriones del útero de alpaca mediante método quirúrgico. Tesis de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 43.

23. Cháves, M; Aba, M; Agüero, A; Egey, J; Berestin, V; Rutter, B. 2002. Ovarian follicular wave pattern and the effect of exogenous progesterone on follicular activity in non-mated llamas. *Animal Reproduction Science*. 69, 37-46.
24. Chen, B; Yuen, Z; Pan, G. 1985. Semen induced ovulation in the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 73, 335-339.
25. Ciprián, A. 2000. Efecto del plasma seminal como factor de ovulación en alpacas y llamas. Puno: Tesis Médico Veterinario y Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNA. 57.
26. Condorena, N; Velasco, J. 1977. Comparación de dos sistemas de empadre en la alpaca. Resúmenes de Proyectos de Investigación UNMSM. Tomo II. Lima-Perú. 98.
27. Correa, J; Ratto, M; Gatica, R. 1997. Superovulation in llamas (*Lama glama*) with FSH and equine chorionic gonadotrophin used individually or in combination. *Animal Reproduction Science*. 46, 289-296.
28. Cosio, M. 2000. Morfología de los embriones de alpaca (*Lama pacos*) de la raza huacaya del tercer al décimo día de gestación temprana. Centro experimental La Raya – Cusco 1999. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. Universidad Católica Santa María. 23.
29. Del Campo, M; Del Campo, C; Adams, G; Ginther, O. 1996. Vascular provisions for a local utero – ovarian cross – over path way in new World camelids. *Theriogenology* 43:21 – 30.

30. Del Campo, M; Del Campo, C; Donoso, M; Ginther, O. 1997. Recuperación y morfología de ovocitos de llamas (*Lama glama*). I Congreso Mundial sobre camélidos. Cajamarca-Perú. 7.
31. Driancourt, M; Fry, R. 1992. Effect of superovulation with FSH or PMSG on growth and maturation of the ovulatory follicles in sheep. *Animal Reproduction Science*.27, 279-292.
32. England, B; Foote, W; Matthews, D; Cardozo, A; Riera, S. 1969. Ovulation and Corpus luteum function.
33. England, G; Foote, W; Cardozo, A; Matthews, D; Riera, S.1971. Estrus and mating behaviour in the llama (*Lama glama*). 19, 722-726.
34. Elsden, R; Nelson, L; Seidel, G. 1978. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare serum gonadotrophin. *Theriogenology*. 9, 17-26.
35. Elwishy, A. 1992. Functional morphology of the ovaries of the dromedary camel. Camel Conference. R&W Publications (Newmarket), UK.149-154.
36. Evangelista, S; Cordero, A; Santini, A; Vazques, M; Huanca, T; Huanca W. 2007. Efecto Del tratamiento con progesterona-eCG sobre La calidad embrionaria en llamas. APPA –ALPA – Cusco, Perú.
37. Fernández – Baca, S; Novoa, C. 1968. Conducta sexual de la alpaca (*Lama pacos*) en empadre a campo. A.L.P.A. Memoria. 3, 7-20.
38. Fernández-Baca, S. 1970. Luteal function and the nature of reproductive failures in the alpaca. Ph.D. Thesis. Cornell University Ithaca, New York.

39. Fernández-Baca, S; Maden, DHL; Novoa, C. 1971. Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca. *Journal of Reproduction and Fertility*. 22,261-267.
40. Fernández-Baca, S; Novoa, C; Sumar, J. 1972. Actividad reproductiva en la alpaca mantenida en separación del macho. *ALPA*. 7, 7-18.
41. Fernández-Baca, S, Novoa, C; Sumar, J. 1974. Pubertad en alpacas. *Avances de Investigación. Boletín N° 15. IVITA UNMSM. Lima-Perú*.129-138.
42. Franco, E; Sumar, J; Varela, M. 1981. Eyaculación en la alpaca (*Lama pacos*). IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Corporación Nacional Forestal. Instituto de la Patagonia, Chile - Punta Arenas, 22-27 de noviembre.
43. Franco, E; Ordoñez, C; Ampuero, E. 1999. Retorno del celo y fertilidad de alpacas post superovulación utilizando PGF2 α . XXI Reunión Científica Anual APPA. Huancavelica-Perú. 86.
44. Franklin, W. 1983. Contrasting socioecologies of South America wild camelids: The vicuña and the guanaco. *Advances in the Study of Mammalian Behaviour*. 7, 573-629.
45. García, A. 2010. Los pastos y la importancia en la alimentación en el ganado. *Revista de investigación INIA- Ayacucho*.P.5-9,11-15 pp.
46. González-Mencio, F; Manns, J; Murphy, B. 1978. FSH and LH activity of PMSG from mares at different stages of gestation. *Animal Reproduction Science*. 1, 137-144.

47. Grimek, H; Gorski, J; Wentworth, B. 1979. Purification and characterization of bovine Follicle-Stimulating hormone: comparison with ovine follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*. 104, 140-147.
48. Hafez, ESE. 2000. Reproducción e Inseminación Artificial en animales. 7ª ed. México. Interamericana McGraw – Hill. 117.
49. Hafez, ESE; Hafez, B. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª. Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Editores S.A. de C.V. México. 519, 33-69.
50. Herrler, A; Elsaesser, F; Parvizi, N; Niemann, H. 1991. Superovulation of dairy cows with purified FSH supplemented with defined amounts of LH. *Theriogenology*. 35 633-643.
51. Huanaco, E; Rodríguez, T. 1986. Informe preliminar sobre comparación de los sistemas de empadre en alpacas. Resumen I Convención Nacional en producción de camélidos sudamericanos. Oruro Bolivia. 7-14.
52. Huanca, W; Cárdenas, O; Cordero, A; Huanca, T; Sapana, R.1999. Respuesta ovárica a gonadotropinas (eCG y hCG) en alpacas durante la época seca. II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco-Perú. 92.
53. Huanca, T; Cárdenas, O; Huanca, W; Sapana, R; Cordero, A. 2000. Effect of eCG and hCG on ovarian response in alpaca. 14th International Congress on Animal Reproduction. 2-6 Julio. Stockholm- Suecia.

54. Huanca, W; Cárdenas, O; Olazábal, C; Ratto, M; Adams, G. 2001. Efecto hormonal y empadre sobre el intervalo a la ovulación en llamas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 1, 462-463.
55. Huanca, T; Huanca, W. 2003. Effect of GnRH analogous (acetate of buserelina) and double mating on conception rate in llamas. Abstracts of IX World Conference on Animal Production. 26-31 Octubre. Porto Alegre - Brazil. 219.
56. Huanca, W; González, M; Cordero, A; Huanca, T. 2006. Comportamiento reproductivo de donadoras de embriones, después de un protocolo de superovulación en llamas. Resumen V Congreso Mundial de Camélidos, Catamarca - Argentina.
57. Huanca, T. 2008. Efecto de la administración de gonadotropinas exógenas (FSH Y eCG) en la respuesta ovárica y producción de embriones en alpacas (*vicugna pacos*). 81-99.
58. IETS. 1983. IETS proposed guide for classification of embryos. Embryo Transfer Newsletter, published by the International Embryo Transfer Society 2, 9.
59. Johnston, L. 1988. Llama reproduction In Medicine Workshop for Veterinarians. Colorado State University, For Collins, Appendix 10b.
60. Kanitz, W; Becker, F; Schneider, F; Kanitz, E; Leiding, C; Nohner, H; Pohland, R. 2002. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. 42, 587-599.

61. Larico, J. 1987. Influencia de la alimentación en la reproducción de la alpaca ALLPAK'A. Revista de investigaciones Sobre Camélidos Sudamericanos. Vol. 1 N° 3. UNA. Puno.
62. Lauderdale, J; Zimbelman, R. 1974. Techniques in female reproduction. A. detection and synchronization of estrus. Reproduction in Farm Animals. Lea and Febiger, Philadelphia - USA.432-436.
63. Leyva, V; García, W. 1999. Efecto de la progesterona exógena sobre la función del cuerpo lúteo de alpacas. Resumen del II Congreso Mundial de Camélidos. Cusco - Perú. 87.
64. Monniaux, D; Chupin, D; Saumande, J. 1983. Superovulatory responses of cattle. Theriogenology. 19, 55-81.
65. Moor, R; Kruip, A; Green, D. 1984. Intra ovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation. Theriogenology. 22, 103-116.
66. Novoa, C. 1970. Reproduction in the camelidae. Journal of Reproduction and Fertility (review). 22, 3-20.
67. Novoa, C; Fernández-Baca, S; Sumar, J; Leyva, V. 1972. Pubertad en la alpaca. Revista de investigaciones pecuarias (IVITA). UNMSM, Lima - Perú. 1, 29 – 35.
68. Novoa, C. 1991. Fisiología de la reproducción de la hembra. Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago de Chile. 428, 91-110.

69. Novoa, C; Franco, E; García, W; Pezo, D. 1999. Dosis de Gonadotropinas (eCG y hCG), superovulación y obtención de embriones en alpacas. RIVEP. Perú. 10(1), 48-53.
70. Panez, S. 2007. Efecto del sitio de deposición del plasma seminal sobre la tasa de ovulación y formación del cuerpo lúteo en alpacas. Tesis de Médico Veterinario. UNMSM. 43.
71. Papkoff, H. 1978. Relationship of PMSG to the pituitary gonadotrophins. En: Control of reproduction in the cow. Ed. J.M. Srrenan. Martín Nijhoff, The Hague. 73-86.
72. Palomino, H; Medina, E; Li, O; Gomez, E; Sumari, E; Clavo, N; Alvarez, M; Chang, S; Pando, L. 1996. Transplante de embriones en alpacas. I Congreso Mundial sobre Camélidos. Cajamarca - Perú.26.
73. Pollard, J; Littlejohn, R; Scott, I. 1994. The effect of mating on the sexual receptivity of female alpacas. . Animal Reproduction Science. 34, 289-297.
74. Ratto, M; Gomez, C; Wolter, M; Berland, M; Adams, G. 1999. Superstimulatory response and oocyte collection in alpacas. II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco - Perú. 96-97.
75. Ratto, M; Singh, J; Huanca, W; Adams, G. 2003. Ovarian follicular wave synchronization and pregnancy rate after fixed-time natural mating in llamas. Theriogenology. 60, 1645-1656.

76. Ratto, M. 2005. Ovarian follicular synchronization, ovulation and oocyte development in llamas and alpacas. PhD. Thesis University of Saskatchewan. Saskatoon - Canada.1-150.
77. San Martín, M; Copaira, M; Zuñiga, J; Rodríguez, R; Bustinza, G; Acosta, L. 1968. Aspects of reproduction in the alpaca. *Journal of Reproduction and Fertility*. 16, 395-399.
78. SAS Institute Inc. 2009. SAS/STAT ® 9.2 User's Guide, Second Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc.
79. Sirard, M; Robert, C; Gagné, D; Barnes, F; Bousquet, D. 2000. Oocyte quality and embryo production in cattle. *Biocell* 24. (3), 256.
80. Smith, T. 1985. Reproduction in South American Camelids. *Lowa State University Veterinary*. 47, 110-115.
81. Steel, R; Torrie, J. 1996. Bioestadística: principios y procedimientos. Segunda edición. Editorial McGraw-Hill. México.
82. Stringfellow, D; Seidel, S .1998. Manual of the international embryo transfer society. Third Edition. International Embryo Transfer Society. Printed the United States of America. 1-169.
83. Sumar, J; Franco, E. 1974. Ensayos de Transferencia de Embriones en Camélidos Sudamericanos. IN: Informe Final (IVITA) UNMSM. Lima - Perú.
84. Sumar, J. 1985. Algunos aspectos obstétricos de la alpaca. *Boletín Técnico* N° 2.

85. Sumar, J. 1988. Renoval of the ovarios or ablation of the corpus luteum and its effect on the maintenance of gestation in the alpaca and llama. *Activated Veterinary Scand.* 83, 133-141.
86. Sumar, J. 1993. Efectos de los estímulos de inducción en la ovulación de alpacas y llamas. *Investigaciones Pecuarias.* Vol. 6 N° 1. 01-07.
87. Sumar, J; Adams, G. 1997. Reproductive anatomy and physiology of the female llama. In: Youngquist, R.S. (Ed.), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology.* WB Saunders, Philadelphia - USA. 792-798.
88. Taylor, S; Taylor, P. 2000. Successful commercial embryo transfer in the llama (*Lama glama*). *Theriogenology.*
89. Taylor, S; Taylor, P; James, A; Denniston, R; Godke, R. 2001. Alpaca offspring bom after cross species embryo transfer to llama recipients. *Theriogenology.* 53, 1-344.
90. Vásquez, M. 2005. Efecto del plasma seminal separado en base al peso molecular, sobre la inducción de ovulación en llamas (*Lama glama*). Tesis de Médico Veterinario. UNMSM. 34.
91. Vásquez, M; Cervantes, M; Cordero, A; Cárdenas, O; Huanca, W. 2007. Estudio preliminar sobre Vitrificación de embriones de alpacas Resumen XXX Reunión Asociación Peruana de Producción Animal - Cuzco, Perú.
92. Vaughan, J. 2001. Control of ovarian follicular growth in the alpaca (*Lama pacos*). PhD. Thesis Central Queensland University.
93. Vaughan, J; Macmillan, K; D'Occhio, M. 2004. Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Animal Reproduction Science.* 353-361.

94. Velásquez, C; Novoa, M. 1999. Superovulación con PMSG aplicada en fase folicular y fase luteal en alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias Perú.* (1), 10.
95. Vivanco, W; Cárdenas, H; Bindon, B. 1985. Relación entre la duración de la copula y momento de la ovulación en alpacas. Libro de resúmenes V Convención Internacional sobre camélidos sudamericanos. Cusco - Perú. 19.
96. Yamamoto, M; Oe, M; Fujii, C; Suzuki, T. 1993. Superovulation in cow given a single intramuscular injection of follicle stimulating hormone dissolved in polyvinyl pyrrolidone. Japan. *Veterinary Medicine Association.* 46, 554-556.
97. Zieba, D; Amstalden, M; Morton, S; Maciel, M; Keisler, D; Williams, G. 2004. Regularity roles of leptin at the hypothalamic Hypophyseal Axis before and after sexual maturation in cattle. *Biology Reproduction* 71: 804 – 812.

ANEXOS



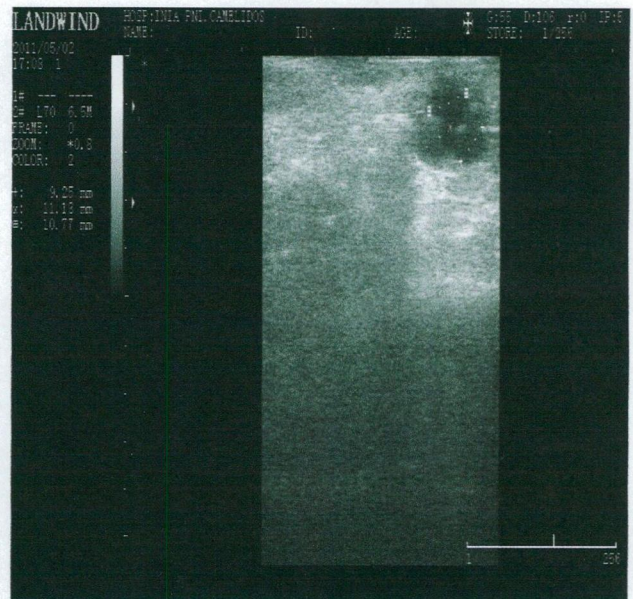
Anexo 01. Lugar de estudio.



Anexo 02. Selección de animales.



Anexo 03. Hormonas utilizadas en el
Tratamiento hormonal.



Anexo 04. Superestimulación ovárica.



Anexo 05. Aplicando tranquilizante.



Anexo 06. Aplicando anestesia epidural baja.



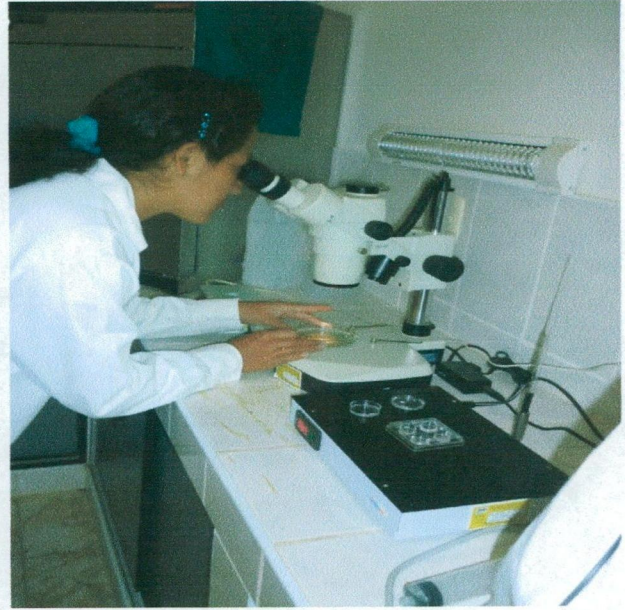
Anexo 07. Introduciendo el catéter foley.



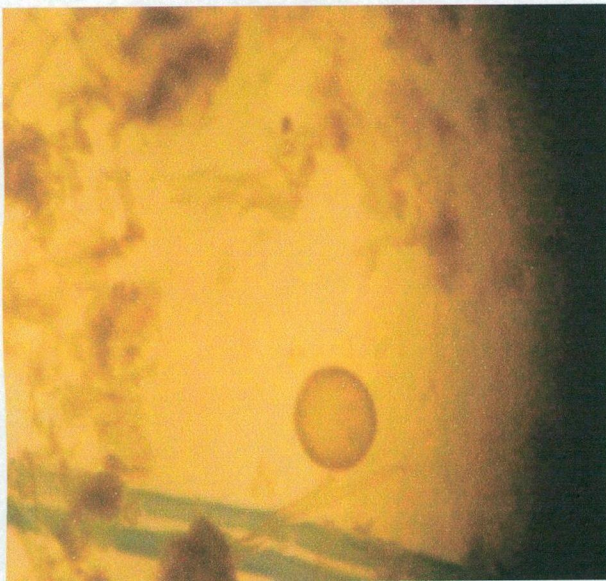
Anexo 08. Medio para lavado de embriones.



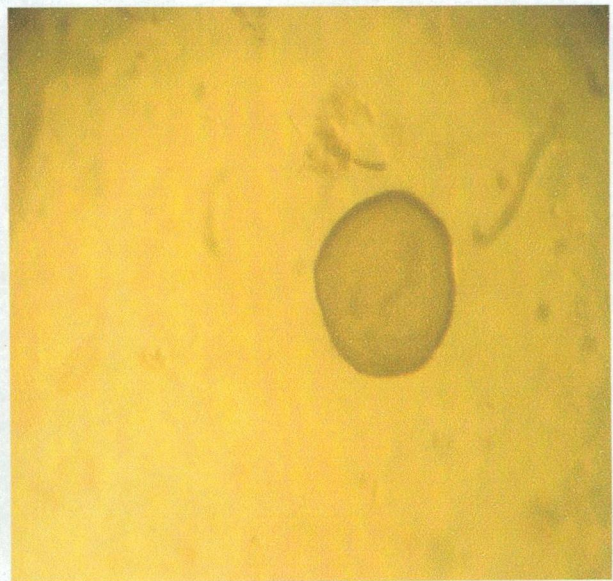
Anexo 09. Filtrado del medio con embriones.



Anexo 10. Búsqueda de embriones.







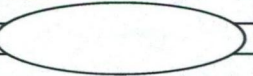


















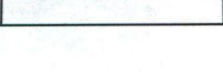
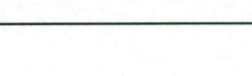










Blastocisto de excelente calidad



Blastocisto de buena calidad

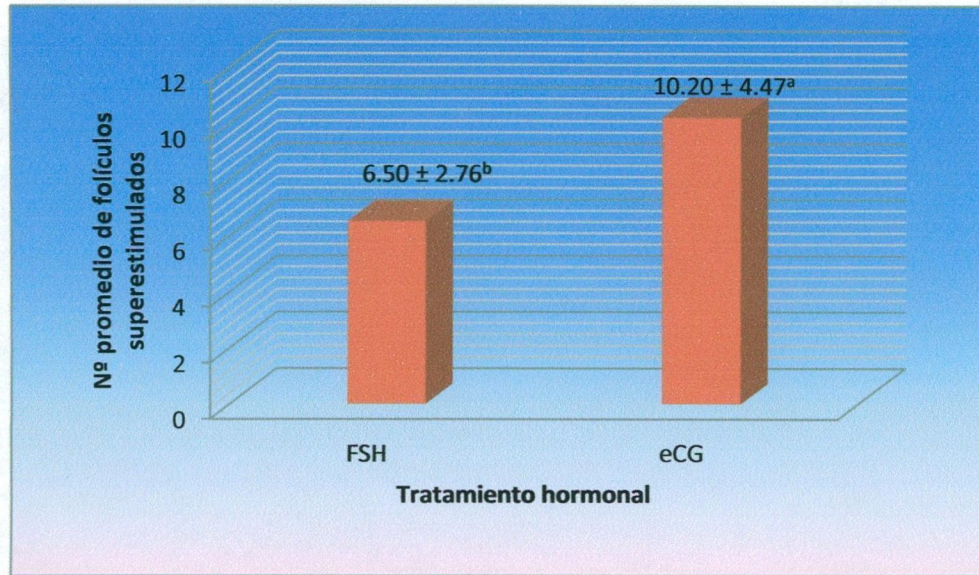
Anexo 11. Embriones colectados durante el lavado.

Anexo 12. Ficha individual de recolección de datos de las alpacas donadoras.

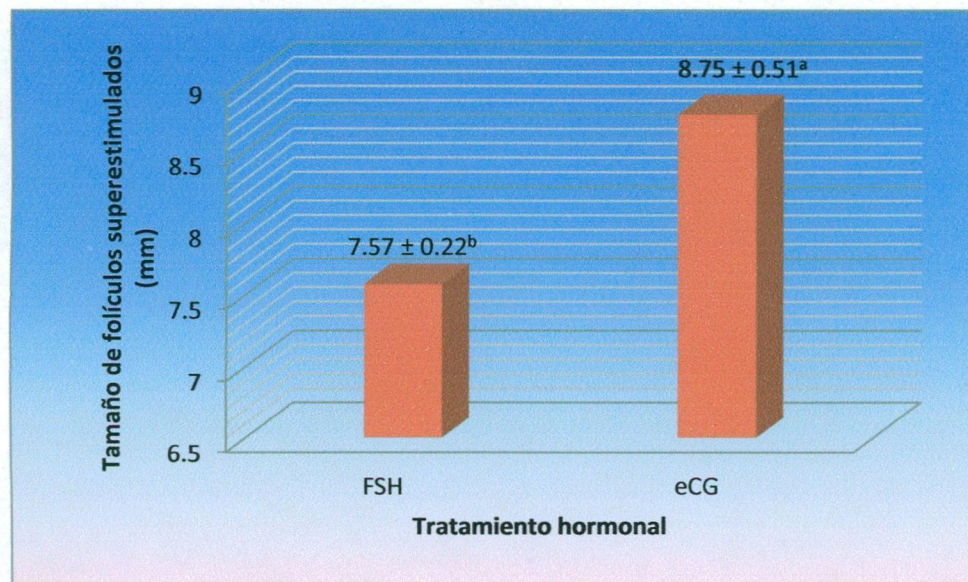
		DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION AGRARIA SUB DIRECCION NACIONAL DE INVESTIGACION EN CRIANZAS PROYECTO NACIONAL DE INVESTIGACION EN CAMELIDOS	
		CONVENIO: GOBIERNO REGIONAL SUB PROYECTO: BIOTECNOLOGIA REPRODUCTIVA DE ALPACAS	
GRUPO A			
ARETE:		RAZA:	COLOR:
Dia	Ovario Derecho	Ovario Izquierdo	Observaciones
			
			
			
			
			
			
			
			
			
			
			
			
			
			
			
			
			

Anexo 13. Esquema del Protocolo de Superovulación

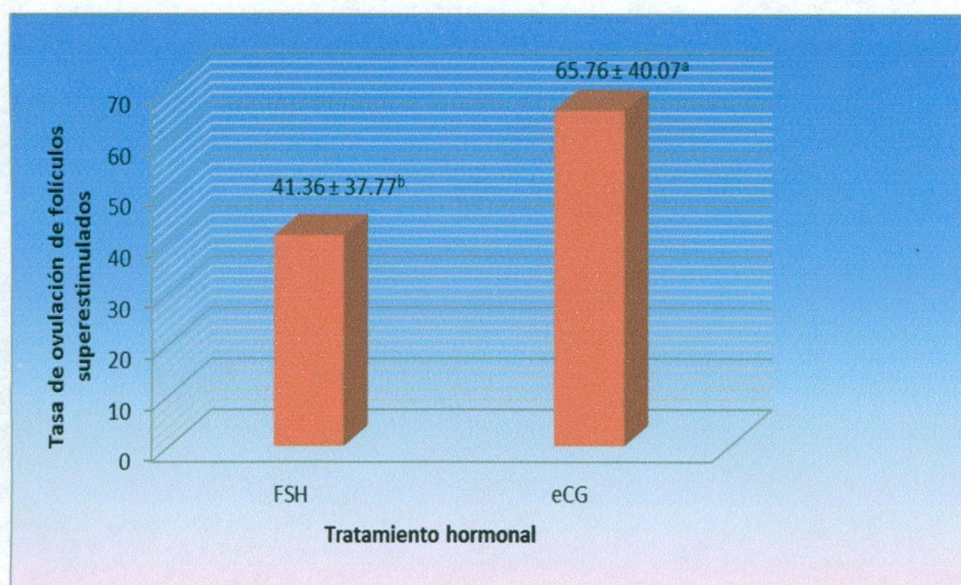
Día	G.A (eCG)	G.B (FSH)
	(700 U.I)	(200 mg)
0	Eco + GnRH	
1		Eco + GnRH
2	Ecografía	
3	eCG	Ecografía
4		FSH (40 mg)
5		FSH (30 mg)
6	Pgf2 α	FSH (18 mg)
7	Empadre + GnRH	FSH (12 mg) + Pgf2 α
8		Empadre + GnRH
9		
10		
11		
12		
13		
14	Lavado T.E	
15		Lavado T.E



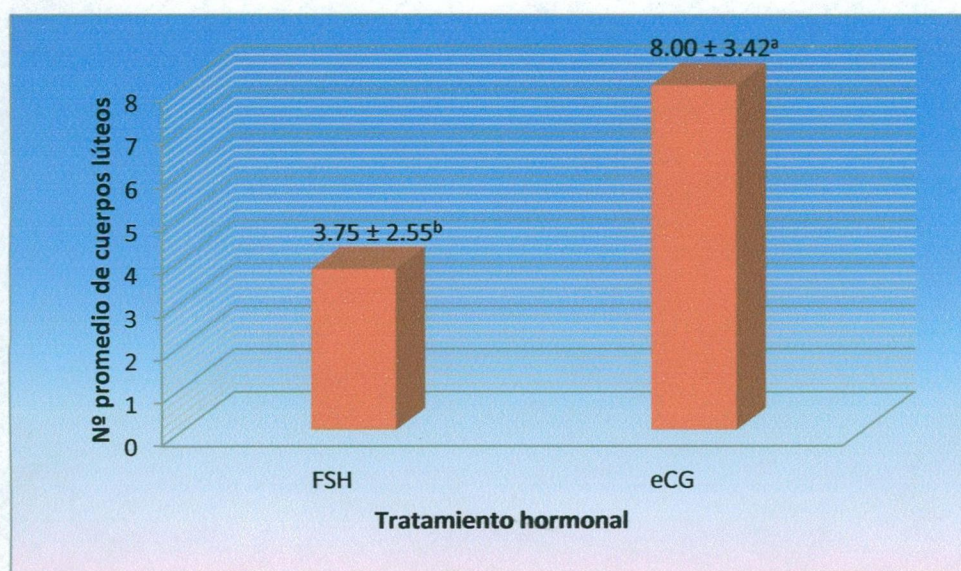
Anexo 14: Número promedio de folículos superestimulados por hembra, según tratamiento hormonal en alpacas Huacaya. E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011.



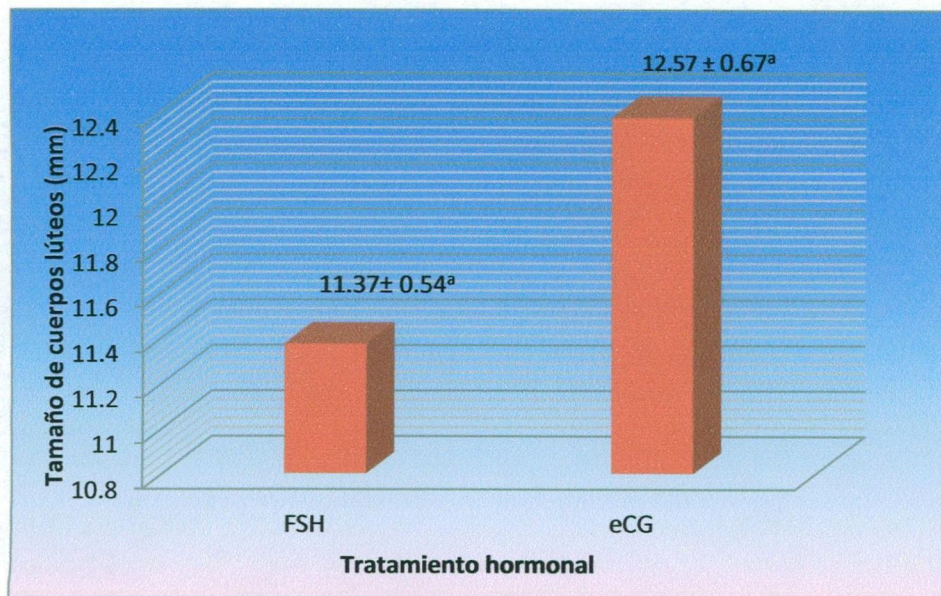
Anexo 15: Tamaño promedio de folículos (mm), según tratamiento hormonal en alpacas Huacaya. E.E.A. CANAAN – INIA. Ayacucho, 2011.



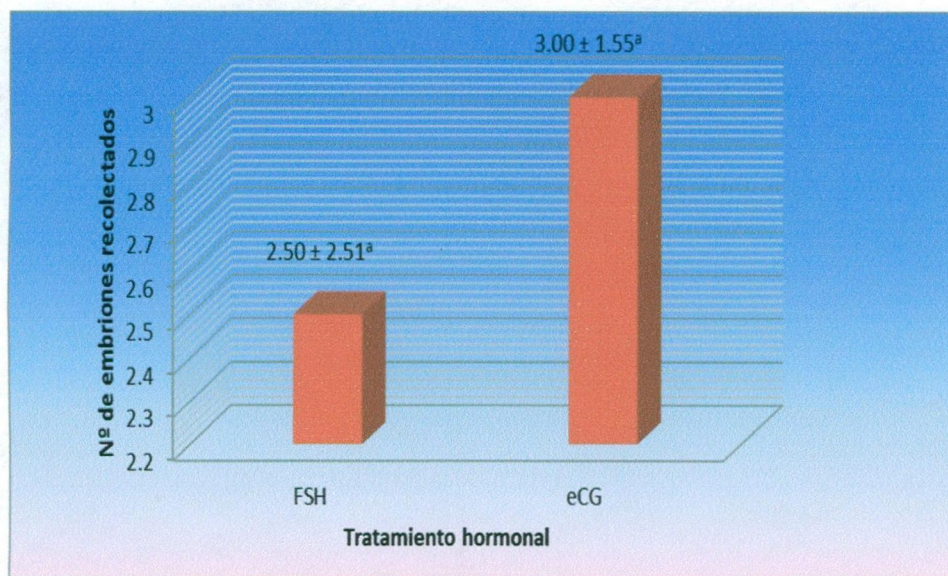
Anexo 16: Tasa de ovulación, según tratamiento hormonal en alpacas huacaya. E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011.



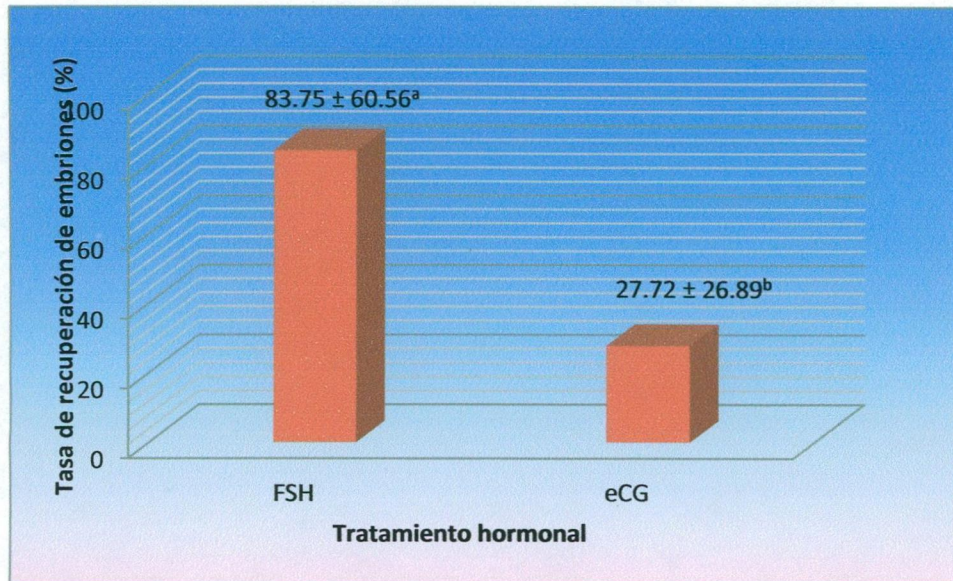
Anexo 17: Número promedio de cuerpos lúteos, según tratamiento hormonal en alpacas huacaya. E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011.



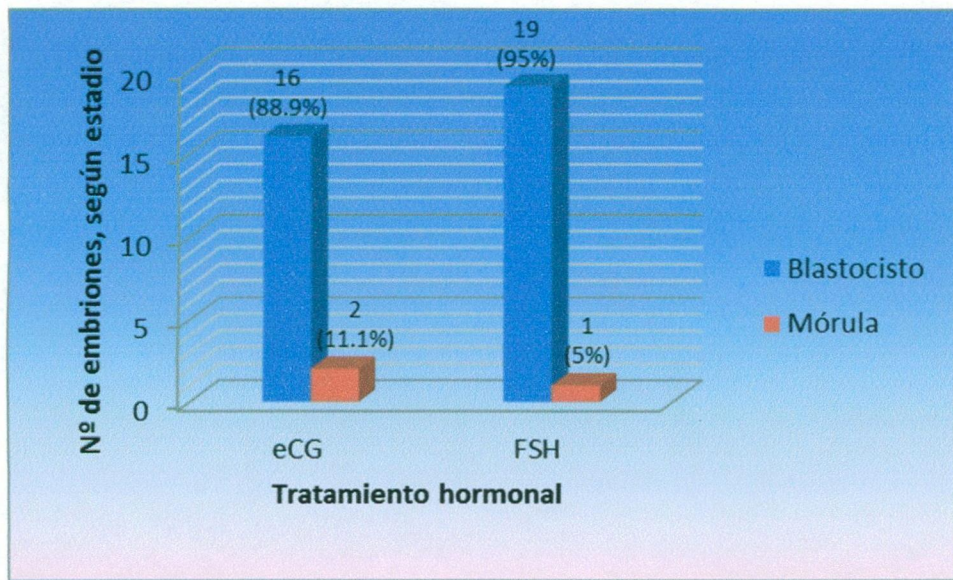
Anexo 18: Tamaño promedio de cuerpos lúteos, según tratamiento hormonal en alpacas huacaya. E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011.



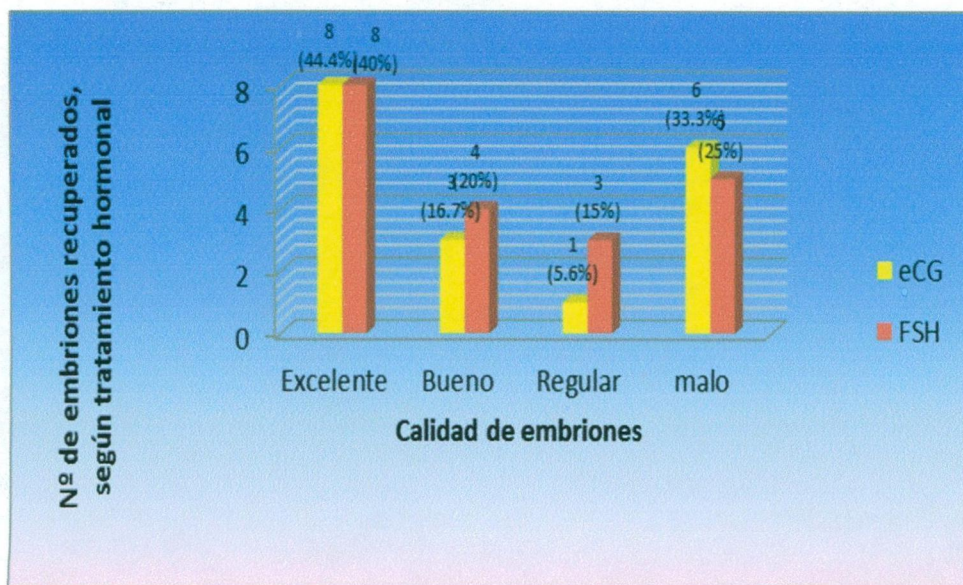
Anexo 19: Número promedio de embriones recuperados post superestimulación ovárica según tratamiento hormonal en alpacas huacaya. E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011



Anexo 20: Tasa de recuperación de embriones post superestimulación ovárica, según tratamiento hormonal en alpacas huacaya. E.E.A. CANAAN-INIA. Ayacucho, 2011.



Anexo 21: Contingencia del tratamiento hormonal de la hembra, sobre el estado del embrión en alpacas huacaya. E.E.A. CANAAN-INIA. Ayacucho, 2011.



Anexo 22: Contingencia del tratamiento hormonal de la hembra, sobre la calidad del embrión en alpacas huacaya. E.E.A. CANAAN - INIA. Ayacucho, 2011.

Anexo 23: Ajuste para comparaciones múltiples: **Tukey-Kramer**

Tabla 23.1. Número de folículos

H0: Media

LS1=

MediaLS2

HORM	NF LSMEAN	Pr > t
FSH	2.68866990	0.0460
eCG	3.28524135	

Tabla 23.2. Tamaño de folículos

H0: Media

LS1=

MediaLS2

HORM	TF LSMEAN	Pr > t
FSH	7.36555556	0.0246
eCG	8.64777778	

Tabla 23.3. Número de cuerpos lúteos

H0: Media

LS1=

MediaLS2

HORM	NF LSMEAN	Pr > t
FSH	2.00346467	0.0170
eCG	2.84489619	

Tabla 23.4. Tamaño de cuerpos lúteos

H0: Media		
LS1=		
MediaLS2		
HORM	TF LSMEAN	Pr > t
FSH	10.9529167	0.1569
eCG	12.1554167	

Tabla 23.5. Tasa de ovulación

H0: Media		
LS1=		
MediaLS2		
HORM	TF LSMEAN	Pr > t
FSH	31.6242588	0.1207
eCG	52.6648485	

Tabla 23.6. Número de embriones

H0: Media		
LS1=		
MediaLS2		
HORM	NF LSMEAN	Pr > t
FSH	1.73414578	0.5850
eCG	1.89930167	

Tabla 23.7. Tasa de recuperación embrionaria

H0: Media		
LS1=		
MediaLS2		
HORM	TF LSMEAN	Pr > t
FSH	64.1652083	0.0144
eCG	25.0339583	