

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE
HUAMANGA**

(Segunda Universidad Fundada en el Perú)

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE MEDICINA
VETERINARIA**



**“RECUPERACIÓN SUCESIVA DE EMBRIONES Y RETORNO
FOLICULAR POST LAVADO EN ALPACAS (*Vicugna pacos*)
HUACAYA DONADORAS NATURALES A 2735 m.s.n.m.
AYACUCHO 2011”.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
MÉDICO VETERINARIA**

**PRESENTADO POR:
JENINE PINEDA TELLO**

AYACUCHO – PERÚ

2012

**“RECUPERACIÓN SUCESIVA DE EMBRIONES Y RETORNO FOLICULAR
POST LAVADO EN ALPACAS (*Vicugna pacos*) HUACAYA DONADORAS
NATURALES A 2735 m.s.n.m. AYACUCHO 2011”**

Recomendado : 26 de abril de 2012
Aprobado : 04 de mayo de 2012



Mg. CARLOS ALBERTO PISCOYA SARMIENTO
Presidente del Jurado



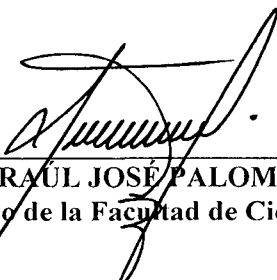
M.V. ALFREDO POZO CURO
Miembro del Jurado



Ph. D. JORGE ERNESTO GUEVARA VÁSQUEZ
Miembro del Jurado



M.V. ALDO ALEXI CIPRIAN CARREÓN
Miembro del Jurado



M.Sc. ING. RAÚL JOSÉ PALOMINO MARCATOMA
Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias

DEDICATORIA

A Dios, por haberme concedido el regalo de la existencia y porque me hace crecer para ser una mejor persona día a día.

A mis padres Felicitas y Máximo, quienes me dieron la vida y con su invaluable sacrificio me brindaron cariño y educación, forjaron valores, pilares fundamentales para desenvolverme personal y profesionalmente en un mundo cada día más competitivo.

A mis hermanos Max Esteban y Antonela, que han estado conmigo siempre en los malos y buenos momentos, compartiendo juntos lo que la vida nos ha sabido procurar.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga**, alma máter que me brindó los conocimientos básicos para mi futuro desempeño profesional.

A la **Facultad de Ciencias Agrarias**, por ser el sustento académico de mi formación técnico-científico.

A la **Escuela de Formación Profesional de Medicina Veterinaria**, por albergarme en sus aulas durante cinco años y cuyos docentes tuvieron la labor de forjarme como persona y futura profesional en el contenido teórico y práctico en las ciencias de la Medicina Veterinaria.

Al **M.V. Alfredo Pozo Curo**, asesor y amigo por su incondicional apoyo durante el desarrollo y culminación de este trabajo de tesis.

A la **Estación Experimental Agraria Canaán - INIA - Ayacucho** y a sus trabajadores por la total colaboración brindada durante el tiempo en que se desarrolló este trabajo de investigación.

Al **D.M.V.Z. M.Sc. Teodosio Huanca Mamani**, quien más que un coasesor fue un maestro y mentor, compartiendo sus juicios y experiencias en el campo de la biotecnología reproductiva en camélidos sudamericanos.

A mis grandes amigos y amigas quienes directa e indirectamente me han brindado su cooperación absoluta y con quienes he compartido los instantes tristes, importunos, alegres y divertidos de la vida universitaria.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
 CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
1.1. Antecedentes de investigación.....	3
1.2. Anatomía reproductiva de la alpaca hembra.....	5
1.3. Pubertad en la alpaca hembra.....	6
1.4. Estación reproductiva de las alpacas.....	6
1.5. Patrón de acontecimientos ováricos en la alpaca.....	7
1.6. Anatomía reproductiva del macho	11
1.7. Pubertad en la alpaca macho.....	12
1.8. Producción y características del semen de alpaca.....	12
1.9. Receptividad sexual y conducta de apareamiento.....	13
1.10. Gametogénesis.....	14
1.11. Fecundación.....	19
1.12. Segmentación.....	20
1.13. Desarrollo embrionario temprano.....	22
1.14. Recuperación y transferencia de embriones en camélidos Sudamericanos.....	24
1.15. Clasificación morfológica de los embriones.....	28
 CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1. Lugar de estudio.....	31
2.2. Duración del trabajo	32

2.3. Materiales	32
2.4. Etapas y técnicas.....	34
2.5. Diseño estadístico.....	40
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1. Evaluación de la actividad ovárica.....	43
3.2. Evaluación de embriones recuperados.....	54
3.3. Evaluación de retorno folicular.....	61
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	63
RESUMEN	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXOS	77

INTRODUCCIÓN

La crianza de alpacas, es una actividad de gran importancia socio-económica para el poblador alto andino, porque suministra fibra valiosa para la industria textil y carne como fuente importante de proteína animal. Sin embargo, una limitante en el desarrollo de la ganadería de los camélidos sudamericanos es la baja eficiencia reproductiva. Las investigaciones realizadas en Perú en biotecnología reproductiva en camélidos sudamericanos son escasas. No obstante, los criadores de las comunidades campesinas requieren mejorar la calidad genética de sus animales para incrementar la productividad de fibra y carne. Si se pretende desarrollar un esquema de selección mediante difusión de caracteres deseados dentro de un rebaño utilizando procedimientos de crianza tradicional, nos encontramos frente a una labor difícil y lenta. Ello, motivado por el prolongado periodo de gestación (11 meses) que sólo permite obtener una cría por año y que a lo largo de toda su vida reproductiva sólo se obtenga un número máximo de seis descendientes, esto sumado a que las preñeces logren llegar a término.

En camélidos, el desarrollo y aplicación de biotecnologías reproductivas ha sido limitado por diferentes factores. Los ensayos sobre transferencia de embriones en camélidos en nuestro país y a nivel mundial han sido realizados en base a protocolos que se utilizan en otras especies; por este motivo, es necesario diseñar y desarrollar protocolos de producción y colección de embriones en forma sucesiva, producidos de forma natural y sin el uso de hormonas exógenas. Este trabajo permitiría incrementar el número de descendientes obtenidos a partir de estos animales, aprovechando el potencial genético del macho como de la hembra, lo que facilitaría la obtención y difusión de reproductores de alta calidad genética.

El presente trabajo de investigación tuvo los siguientes objetivos:

Objetivo General

Evaluar un procedimiento de producción y colección de embriones de alpacas hembra de la raza Huacaya donadoras naturales, de manera sucesiva, obtenidos de forma natural, sin utilización de hormonas exógenas.

Objetivos específicos

- Evaluar la actividad ovárica de las alpacas Huacaya donadoras naturales durante la producción y colección de embriones de manera sucesiva, obtenidos de forma natural.
- Evaluar la calidad de los embriones recuperados de manera sucesiva, obtenidos de forma natural.
- Evaluar el tiempo de retorno folicular después de cada lavado y recuperación de embrión.

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN

La recuperación embrionaria puede ser realizada vía quirúrgica o no quirúrgica. El primer reporte sobre colección de embriones fue realizado de oviductos de alpaca, previa laparotomía (Novoa y Sumar, 1968).

Años más tarde fue reportado el nacimiento de la primera cría de alpaca obtenida mediante transferencia de embriones (Sumar y Franco, 1974).

Posteriormente se reporta la colección de un embrión viable, a partir de dos llamas hembras donantes, mediante una técnica no quirúrgica a los 7 días y la transferencia de manera no quirúrgica en fresco, con el nacimiento de una cría (Wilson Wiepzy y Chapman, 1985).

Otros estudios confirman que la recuperación de embriones en estadio de blastocisto puede ser realizada a los 7 días post servicio mediante técnicas no quirúrgicas en llamas y alpacas. La técnica de

recuperación no quirúrgica utilizada en camélidos es similar a la descrita en vacunos y los embriones recuperados observados y evaluados en un estereoscopio (Huanca y Col., 2004).

Igualmente, se ha reportado la recuperación de 37 embriones a partir de 47 llamas hembras no estimuladas (79%), de las cuales se obtuvieron 27 embriones viables y resultando en un 41 % de preñez al ser transferidas a hembras receptoras (Taylor y Col., 2000).

En el Centro experimental La Raya – Cusco, 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 Grupo de Superestimuladas; se determinó que en el 100% de los casos en hembras control, se encontró un solo embrión; el 31.25% se colectó del lado derecho y el 68.75% del izquierdo, mientras que en las hembras estimuladas (eCG), se pudo recolectar un promedio de 3.9 (± 3.17) embriones, donde la ubicación del embrión encontrado por el lavado indica que el 49.30% de embriones se ubicaron en el cuerno uterino derecho y el 50.70% en el izquierdo (Cosio, 2000).

La recuperación de llamas y alpacas hembras superestimuladas fue evaluada, habiéndose observado un restablecimiento del tracto reproductivo, determinado por ecografía, a las 3 semanas posteriores al lavado uterino. Además se logró una tasa de preñez luego de ser servidas, del 40 % con un solo servicio (Huanca y Col., 2006).

Así mismo, en un trabajo realizado para determinar el momento óptimo para recuperar embriones del útero de alpaca mediante método no quirúrgico, se determinó, que en las alpacas superovuladas con eCG, los embriones pueden ser recuperados del oviducto hasta el día 5 y del cuerno uterino desde el día 6 post cópula (Cervantes, 2008).

1.2. ANATOMÍA REPRODUCTIVA DE LA ALPACA HEMBRA

Los ovarios tienen una forma globular irregular, similar a los de la cerda, en particular cuando tienen folículos múltiples. En la alpaca, los folículos entre 5 y 12 mm se consideran normales. El útero de la alpaca es bicorne y ambos oviductos son grandes y están arrollados; terminan en una bolsa que circunda por completo el ovario. Las puntas de los cuernos uterinos en las alpacas y llamas son romas y redondeadas, y el oviducto se abre en el cuerno uterino mediante una pequeña papila elevada que actúa como un esfínter bien definido. El cérvix tiene dos o tres pliegues con forma anular o espiral irregular. El cuerpo y los cuernos uterinos se palpan fácilmente por el recto (Sato y Montoya, 1990).

La placenta en la alpaca, como en otros camélidos es difusa y de tipo epiteliocorial (Steven D.H. y Col., 1980). Una membrana fetal complementaria exclusiva que encierra todo el cuerpo fetal está adherida en la unión mucocutánea y las bandas coronarias en alpacas, llamas, vicuñas (Sumar, 1997) y guanacos recién nacidos (Merk y Col., 1988).

1.3. PUBERTAD EN LA ALPACA HEMBRA

Las alpacas hembra jóvenes de 12 a 13 meses de edad muestran conducta de estro similar al de las alpacas adultas (Novoa, 1991), aun cuando la actividad ovárica empieza a los 10 meses con la presencia de folículos de 5 mm o más. En un estudio realizado en el sur del Perú con alpacas hembra de un año de edad, se determinó que había una relación muy significativa entre el peso corporal en el apareamiento y las tasas de nacimiento subsecuentes. Por cada kilogramo más de peso, se incrementaba 5% la natalidad, pero cuando el peso corporal excedía los 33 kilogramos, el porcentaje de hembras no preñadas era relativamente independiente del peso corporal (Leyva y Sumar, 1981).

En los sistemas tradicionales de crianza a nivel de comunidades, menos del 50% de las alpacas de un año de edad alcanzan los 33 Kg. de peso corporal en el momento del apareamiento (1 año); por lo tanto, la edad de reproducción se pospone hasta los dos años de edad en alpacas y después de tres años de edad en las llamas. También se ha demostrado que con un mejor nivel de nutrición después del destete (7 a 8 meses de edad), casi el 100% de las alpacas de un año superan los 33 kg de peso corporal (Bustinza y Medina, 1986).

1.4. ESTACIÓN REPRODUCTIVA DE LAS ALPACAS

Estudios con alpacas y llamas en su hábitat natural en la región montañosa del sur del Perú, donde machos y hembras conviven todo el año, mostraron que las actividades sexuales son estacionales, y duran de

diciembre a marzo (meses de verano); estos son los meses más calurosos del año, con lluvia suficiente y abundante forraje verde (San Martín y Col., 1968).

En las alpacas, cuando las hembras se mantiene separadas de los machos y se permite la cópula sólo una vez al mes, ambos sexos tiene actividad sexual durante todo el año; las tasas de ovulación y fertilización, junto con la sobrevivencia del embrión, no se vieron afectadas de manera significativa por la estación del año (Fernández Baca y Col., 1972).

La asociación continua de hembras y machos inhibe la actividad sexual de estos últimos e inclusive provoca que desaparezca por completo (Fernández Baca y Col., 1972). Se desconocen los factores que causan el inicio y la terminación de la actividad sexual bajo condiciones naturales. Factores ambientales, además de la estimulación visual y olfatoria, podrían influir a través del sistema nervioso central (Hafez, 2000).

1.5. PATRÓN DE ACONTECIMIENTOS OVÁRICOS EN LA ALPACA

Debido a que la copulación por lo general es un prelude necesario para la ovulación, la alpaca y la llama se han clasificado como hembras de ovulación refleja o inducida, en oposición a las de ovulación espontánea (San Martín y Col., 1968; England y Col. 1969). Las alpacas no tienen ciclos estruales a diferencia de otras especies domésticas. El estro y la ovulación no se manifiestan de una manera repetitiva, cíclica y predecible (Hafez, 2000).

1.5.1. Desarrollo folicular

Cuando no se exponen a un macho, las alpacas hembras muestran períodos de receptividad sexual prolongados, y periodos breves de rechazo del macho que pueden durar 48 horas (San Martín y Col., 1968), y que pueden correlacionarse con incrementos y decrementos rítmicos de las concentraciones séricas de estrógenos, lo que refleja ondas sucesivas de maduración y atresia de los folículos ováricos (Hafez, 2000).

La variabilidad, tanto en la duración de la receptividad sexual como en la regularidad con la que ocurre, parece reflejar el hecho de que en hembras no preñadas la fase folicular no concluye con la ovulación en un momento predeterminado, y que no hay una fase lútea que delimite la sincronización de los acontecimientos ováricos después del fin del estro (Hafez, 2000).

1.5.2. Dinámica folicular

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 (igual o mayor a 7 mm de diámetro); mientras que los demás regresionan (Bravo y Col., 1990; Fernández Baca, 1993; Brown, 2000).

Las tres fases descritas son: crecimiento, maduración y regresión (Bravo y Col., 1990; Novoa, 1991). En el de maduración el folículo

dominante inhibe el desarrollo de los folículos más pequeños (Bravo y Col., 1990); reportándose una relación inversa entre el diámetro del folículo dominante y el número de folículos pequeños (Adams 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 (Bravo y Col., 1990); mientras que otro estudio determinó un largo total de 20 a 25 días (Adams y Col., 1990); por otro lado un trabajo posterior estableció el largo de la onda en 22.6 ± 2.5 días; siendo la fase de crecimiento (desde 3 mm a su máximo diámetro) de 9.2 ± 2.8 días; maduración (permanencia alrededor del máximo diámetro) de 5.2 ± 1.4 días y regresión (diámetros decrecientes) de 8.2 ± 2.2 días (Aba y Col., 2000); las diferencias encontradas se deberían al estado lactacional de los animales empleados (Adams, 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% (Fernández Baca, 1993); detectándose, después de la ovulación, el cuerpo lúteo, en llamas, en el ovario derecho en 51 %, ovario izquierdo en 47 % y en ambos 2% (Bravo y Col., 1990; Sumar, 2000).

1.5.3. Ovulación

La ovulación puede ocurrir 26 a 30 horas después de la cópula (San Martín y Col., 1968; Adams y Col., 1990) o puede ser inducida artificialmente entre las 24 a 30 horas post inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG), de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y de hormona luteinizante (LH) (Fernández Baca, 1971; Novoa, 1991; Sumar, 1997; Leyva y García, 1999; Aller y Col., 1999; Huanca, 2001).

Las hembras pueden ovular sin estimulación coital u hormonas exógenas, sobre todo cuando al principio se les aísla del macho y luego se les vuelve a presentar ante él. Se informó que la tasa de ovulación espontánea es de aproximadamente 5 a 10% en las alpacas (Sumar, 1985; Fernández Baca, 1971).

No se encontraron diferencias en la tasa de ovulación entre ovarios. Se detectó un cuerpo lúteo en el ovario derecho en 51% de las alpacas, 47% en el izquierdo, y cerca de 2% en ambos (Fernández Baca y Col., 1973),

Los camélidos son especies de ovulación inducida por la cópula, su estímulo proporciona el impulso nervioso necesario para desencadenar la secreción hipofisiaria de la hormona luteinizante (LH), responsable de causar la ruptura folicular y la consiguiente liberación del óvulo (Fernández Baca, 1971). Estudios en bovinos señalan que previo al proceso de ovulación ocurre disociación y descomposición progresiva

de diversas capas celulares que rodean el ápice del folículo preovulatorio como resultado de las actividades de enzimas proteolíticas producidas por las células de la granulosa, por fibroblastos circulantes o por ambos en respuesta a LH, progesterona (P4) y prostaglandina (Hafez, 2000); debido a que cuando la ovulación es inminente, se produce un incremento progresivo de las células apoptósicas, en la superficie epitelial del ovario, túnica albugínea y pared apical del folículo (Murdoch, 1995).

1.6. ANATOMÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO

En la alpaca macho adulta, se observan los testículos pequeños y elípticos, en un escroto no pendular sin un cuello definido y formando una protuberancia subanal. El pequeño epidídimo está firmemente conectado con los testículos y formado por cabeza, cuerpo y cola. El conducto deferente es muy delgado (2 mm) en su inicio, y se engrosa (3 mm) cuando llega a la cavidad abdominal y termina cerca de la vejiga, para formar lo que en otras especies son las ampollas o glándulas ampulares (Sumar, 1985). La próstata de alpaca tiene forma de "H"; descansa dorsal y lateralmente sobre el cuello de la vejiga. Las glándulas bulbouretrales son ovales, localizadas a los lados de la uretra y la salida pélvica. Los camélidos no tienen glándula vesicular. El pene es fibroelástico, y su extremo tiene la forma de un gancho curvo, en dirección de las manecillas del reloj, con una pequeña proyección cartilaginosa de 1 cm de longitud que podría corresponder al "proceso uretral" (Hafez, 2000).

1.7. PUBERTAD EN LA ALPACA MACHO

En el nacimiento, el pene está adherido por completo al prepucio. Estas adherencias desaparecen en forma gradual con el crecimiento del animal bajo la influencia de la testosterona. Al año de edad, los machos muestran interés sexual por las hembras; sin embargo, sólo cerca de 8% de las alpacas macho muestran una separación completa de las adherencias entre el pene y el prepucio y son capaces de realizar la copulación (Sumar, 1985). Sin embargo, la pubertad ocurre cuando el macho es capaz de producir espermatozoides (Hafez, 2000).

1.8. PRODUCCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE ALPACA

El color del semen de alpaca es blanco lechoso a blanco cristalino. El volumen es variable, según el método de recolección. En alpacas, los valores de pH proporcionados por varios autores se acercan mucho a la neutralidad, con cierta tendencia a la alcalinidad ligera (Sumar, 1991).

El semen de alpaca y llama es muy viscoso, lo que dificulta mucho la valoración de su calidad y concentración. Debido a la alta viscosidad del plasma seminal, no hay "motilidad masal" (no hay remolinos), la motilidad progresiva individual es muy lenta (Leyva y Sumar, 1981).

Se han descrito formas más o menos anormales de espermatozoides en la alpaca, como gotas citoplasmáticas proximales y distales, encorvadura de colas, microcabezas, cabezas gemelas y rotura de colas, con semen colectado mediante vagina artificial (Sumar, 1991).

1.9. RECEPTIVIDAD SEXUAL Y CONDUCTA DE APAREAMIENTO

En hembras cuya ovulación es inducida, no hay una definición clara de los eventos asociados al ciclo estrual. En ausencia de la estimulación copulatoria, las alpacas hembras muestran periodos de receptividad sexual hasta de 36 días, con periodos breves de rechazo que pueden durar 48 h (San Martín y Col., 1968). Parece haber una variabilidad considerable para mostrar receptividad abierta entre los individuos, independientemente de la paridad. La variabilidad de la receptividad sexual puede atribuirse sobre todo al grado de madurez del folículo en cualquier estado de la fase folicular continua; sin embargo, no se dispone de ninguna documentación al respecto (Hafez, 2000).

La hembra receptiva adopta la posición particular (recumbencia ventral) después de un breve periodo de persecución por parte del macho, o se acerca a un macho que está copulando con otra hembra y adopta la posición señalada (San Martín y Col., 1968). Si la hembra no está receptiva, el rechazo lo demuestra al correr para alejarse del macho y escupirle (England y Col., 1969).

La cópula es relativamente larga en los camélidos sudamericanos y con períodos variables (Sumar, 1997). 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).

Existen fallas ovulatorias post cópula, que no han sido totalmente explicadas, señalándose que podría ser atribuida a una sensibilidad disminuida de los folículos a los niveles circulantes de LH debido a las variaciones en los estadios de maduración folicular (Fernández Baca, 1971; Novoa, 1989).

En bovinos se conoce que el balance energético negativo decrece la secreción pulsátil de LH, afectando el crecimiento folicular y la oportunidad de que se presente ovulación ya que no ocurre el pico preovulatorio de LH (Schillo, 1992).

1.10. GAMETOGÉNESIS

1.10.1. Oogénesis

La oogénesis se caracteriza por una primera fase que ocurre durante la vida fetal y es común a la espermatogénesis, durante la cual la proliferación mitótica de las células germinales primordiales, predomina sobre la muerte celular programada. El resultado es la formación de un alto número de células germinales dependiendo de la especie, listo para entrar en diferenciación sexual específica (Smitz y Cortvrindt, 2002).

Las células germinales primordiales a las 3 semanas después de la fertilización migran por movimientos ameboides desde el epitelio del saco vitelino vía tejido conectivo del intestino embrionario a la cresta genital, formando el cordón medular primario y el cordón sexual (Smitz y Cortvrindt, 2002).

Los cordones son anatómicamente menos definidos en hembras que en machos. Estos cordones primitivos son colonizados por células germinales primordiales. En fetos hembras las células germinales primordiales son llamadas oogonias al arribar a las gónadas primitivas. Las oogonias están aun interconectadas por puentes citoplasmáticos, luego los cordones primitivos medulares degeneran para ser reemplazados por un estroma ovárico altamente vascularizado. Las células del cordón proliferan y las células del mesénquima se condensan cerca de la oogonia para formar las células de la granulosa en los folículos primordiales (Smitz y Cortvrindt, 2002).

La actividad mitótica de la oogonia cesa y entra en meiosis y entonces la oogonia es llamada oocito. Después que el oocito entra en meiosis en el ovario fetal, estos pasan por la fase de leptoteno, zygoteno y pachiteno antes de ser arrestado en el último estadio meiótico en profase I, el estadio de diploteno en el tiempo de nacimiento. Durante el arrestamiento en profase I los cromosomas se descondensan y son empaquetados dentro de un núcleo conocido como vesícula germinal, el cual puede durar meses o años, dependiendo de las especies. (Smitz y Cortvrindt, 2002).

Esta ampliamente aceptado que en mamíferos una hembra nace con un número fijo de oocitos dentro del ovario, los cuales progresivamente decrecen sin posibilidad de renovarse. De esta manera la mayoría de oocitos mueren durante el periodo fetal inmediatamente después del nacimiento. Los oocitos más pequeños en el ovario son

rodeados por células de la granulosa de forma aplanada para formar los folículos primordiales. La primera señal que el oocito ha empezado la fase de crecimiento es el cambio morfológico en las células de la granulosa, el cual cambia a una forma cuboidal. En este momento los folículos son llamados primarios. Los folículos primarios unilaminares se convierten en folículos secundarios multilaminares seguidos por folículos antrales (terciarios) en el cual se forma una gran cavidad antral llena de fluido. Durante este periodo el oocito también crece, y la zona pelúcida inicia su formación alrededor de este. Adicionalmente, las células somáticas del tejido intersticial adyacente se diferencian en células de la teca y forman la envoltura celular más externa del folículo (Smits y Cortvrindt, 2002).

Durante cada ciclo reproductivo una población de oocitos completa su crecimiento, adquiere una zona pelúcida, y reanuda la meiosis para convertirse en un óvulo no fertilizado (Johnson y Col, 2004). Todos los oocitos no empiezan a crecer al mismo tiempo en los ovarios de los mamíferos, sólo una pequeña población de los oocitos en los folículos primordiales inicia la fase de crecimiento y alcanzan su tamaño antes de la pubertad. Después que ha culminado el desarrollo de los folículos conteniendo oocitos que han terminado también su crecimiento, estos son aptos para responder al surgimiento gonadotrópico. Entonces los oocitos reanudan la meiosis, y progresan de profase a metafase II dentro de los folículos, para finalmente ser ovulados. Este curso meiótico desde la reanudación de la meiosis a

metafase II es llamado "maduración del oocito" (Smitz y Cortvrindt, 2002).

1.10.2. Espermatogénesis

Tal como en el ovario, la función y diferenciación testicular del acercamiento de las células germinales dentro de un compartimiento específico (cordón testicular) y la subsecuente diferenciación de los dos linajes celulares característicos (células Leydig y células Sertoli) dependen de la formación del cordón testicular: células de Leydig produciendo esteroides fuera del compartimiento y células de Sertoli secretando la hormona Antimuleriana (AMH) dentro del compartimiento. En el momento en el que las células germinales masculinas forman parte del cordón testicular toman el nombre de pre-espermatogonia (Grier, 1992).

Si las células germinales no se unen al cordón testicular, ellas degeneran. Sin embargo el acercamiento de estas células germinales no necesariamente asegura la diferenciación normal. Durante el desarrollo testicular temprano la espermatogonia inicia las divisiones mitóticas, y simultáneamente sufren diferenciación morfológica. En roedores las espermatogonias se reúnen en grupos, los que frecuentemente continúan dividiéndose mitóticamente de manera sincronizada después de la diferenciación testicular. Al igual que las oogonias, las espermatogonias están conectadas por puentes intercelulares (Grier, 1992).

Para el funcionamiento testicular normal se requiere de estimulación hormonal por gonadotropinas adenohipofisarias, las cuales a su vez son controladas por la secreción pulsátil de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) del hipotálamo (Hafez, 2000).

De esta manera se inicia la descarga pulsátil de LH, y ésta estimula la producción y liberación de testosterona por las células de Leydig. La testosterona parece actuar sobre las células somáticas de los túbulos seminíferos (células peritubulares y de Sertoli). Así, comienza la formación secuencial de espermatocitos, espermátidas y espermatozoides, hasta que se produzca suficiente esperma para proporcionar el primer eyaculado en la pubertad (Illera, 1994).

Los andrógenos producidos también se difunden hacia las células de Sertoli adyacentes y hacia la sangre, donde ejercen retroalimentación negativa tanto en el hipotálamo como en la hipófisis para bloquear la liberación de LH adicional (Hafez, 2000).

La otra gonadotropina importante es la FSH, que estimula la producción de Proteína Transportadora de Andrógenos (ABP) y de Inhibina por las células de Sertoli. La ABP tiene la función de formar un complejo con andrógeno (testosterona), para luego ser transportada junto con los espermatozoides hacia el túbulo seminífero, y de esta manera permitir el normal funcionamiento del órgano. La inhibina por su parte tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre la FSH, mas no sobre LH (Hafez, 2000).

1.11. FECUNDACIÓN

El transporte de espermatozoides hacia el sitio de fertilización (unión útero-tubal) en la alpaca es de manera gradual, el mayor número (82,7 %) se localiza en el istmo a las 18 horas post cópula; la unión útero-tubal parece ser además el principal reservorio de espermatozoides en la hembra (Bravo y Col., 1996).

El óvulo reanuda la meiosis a partir de la profase I de la primera división meiótica cuando comienza a madurar durante la foliculogénesis. La maduración y la meiosis del óvulo no se completan sino hasta que se termina la fecundación, cuando el óvulo se convierte en cigoto (Hafez, 2000).

Los espermatozoides requieren cambios que ocurren durante el proceso de maduración a su paso por el epidídimo, este tarda 10 a 15 días; después de lo cual es posible la fecundación. Para lograr ser fértil y poder fusionarse al gameto femenino (de la hembra), el espermatozoide experimenta varias secuencias de cambios en su maduración, algunas conocidas y otras desconocidas, incluyendo la "capacitación" y las reacciones acrosomales (Hafez, 2000).

En los mamíferos, para la fecundación se requieren tres acontecimientos críticos: a) migración del espermatozoide entre las células monticulares (si las hay); b) fijación del espermatozoide y migración a través de la zona pelúcida; y c) fusión de las membranas plasmáticas de espermatozoide y óvulo. La unión de la cabeza del espermatozoide a la zona pelúcida es regulada por sitios receptores en la superficie de ésta. La

presencia de glucosiltransferasa, proteinasas y glucosidasas en la membrana plasmática que cubre la cabeza del espermatozoide podría causar la unión a ZP3 a través de un mecanismo de llave/cerradura como el de una enzima y su sustrato (Wassarman, 1990).

Al penetrar el espermatozoide la membrana vitelina, el óvulo activado completa la meiosis y expulsa el primer y/o segundo cuerpo polar en el espacio perivitelino. Los cromosomas haploides maternos restantes son rodeados por un pronúcleo. Los pronúcleos masculino y femenino emigran al centro del óvulo para nuevos arreglos en el armazón citoesquelético del óvulo después de la activación (Hafez, 2000).

1.12. SEGMENTACIÓN

Después de la etapa de cigoto, los embriones experimentan varias divisiones mitóticas. El cigoto, o etapa de una célula, es bastante grande y tiene baja proporción núcleo/citoplasma. Para lograr una proporción similar a la de las células somáticas, experimenta divisiones celulares sin aumento de la masa celular. A este proceso se le denomina segmentación (para diferenciarlo de otras modalidades de división celular, en las cuales además los fragmentos o células hijas se separan físicamente) (McLaren, 1974).

Debido a que las células de los embriones de mamífero contienen poco vitelo (excepto en el cerdo y el caballo), dependen de la madre para gran parte de su sostén metabólico durante las primeras fases de la preñez. Durante las primeras segmentaciones hay poco incremento en la tasa

metabólica, pero ocurre un aumento pronunciado entre las etapas de mórula y blastocisto (Hafez, 2000).

La segmentación del cigoto consiste en la división vertical a lo largo del eje principal, desde el polo animal (sitio de extrusión del cuerpo polar) hasta el polo vegetal (zona de la reserva de vitelo). Las células hijas resultantes son llamadas blastómeros. El plano de la segunda división también es vertical, y pasa por el eje principal, pero en ángulo recto con el plano de la división inicial, produciendo cuatro blastómeros. La tercera división ocurre aproximadamente en ángulo recto respecto a la segunda, y da por resultado 8 blastómeros. Una vez que el embrión ha formado 9 a 16 blastómeros, y en algunos casos más, se denomina mórula, debido a su parecido con una mora (Hafez, 2000).

Es posible que la segregación de las células internas y externas en el embrión de 16 células (mórula) del ratón sea iniciada por cambios morfogénicos que ocurren en la etapa de 8 células. En este momento, los blastómeros se aplanan entre sí para formar un embrión redondo y los componentes celulares internos, además, las microvellosidades superficiales se disponen asimétricamente en un proceso que recibe el nombre de polarización. Los procesos combinados de aplastamiento de los blastómeros y polarización se conocen como "compactación" (Hafez, 2000).

Dentro de la capa trofoblástica en embriones de ratón de 8 a 16 células se forman uniones estrechas cuando los blastómeros están en íntima aposición durante el proceso de compactación. La formación de uniones

estrechas constituye un sello de permeabilidad y permite el movimiento de líquido desde el exterior hasta el interior del blastocisto sin escape sustancial formándose de esta manera el blastocele (Hafez, 2000).

La región inferior de la ampolla es el lugar de la fecundación en la mayor parte de las especies de mamíferos. Cuando el embrión se ha desarrollado hasta las etapas de 8 a 16 células, es transportado al útero, donde continúa su división. El tiempo que los embriones pasan en el oviducto permite al útero prepararse para la función nutricional que debe ejercer una vez que el embrión resida en él (Hafez, 2000).

1.13. DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO

El desarrollo de las uniones intercelulares estrechas de la mórula durante la compactación va seguido por la acumulación de líquido dentro de la cavidad central formando el blastocele. La diferenciación de dos poblaciones celulares distintas ocurre después de la formación del blastocisto. La mayor parte de las células forman la capa cuboide periférica externa, denominada *trofoblasto* o *trofoectodermo*, que está cubierta por densas microvellosidades y participa en la captación selectiva de nutrimentos. En una fase posterior del desarrollo, el trofoblasto dará origen al corion. Un segundo grupo de células que reside en un polo bajo el trofoblasto forman el embrioblasto (masa de células internas), el cual se convierte en las tres capas germinales principales del embrión (ectodermo, mesodermo y endodermo) durante el proceso de la gastrulación (Hafez, 2000).

El desarrollo del embrión después de la fertilización en la alpaca es similar al de otras especies. El estadio de mórula de 4 a 6 blastómeros se observa en el oviducto alrededor del día 4 post cópula, como mórula compacta de gran número de blastómeros por el día 7 y en el útero como estadio de blastocisto por el día 10 (Bravo y Col., 1996).

El *conceptus* (embrión y sus membranas) produce esteroides, prostaglandinas, proteínas y posiblemente otros agentes no identificados que pueden jugar un rol en el establecimiento y mantenimiento de la preñez, siendo la clave en este proceso la protección del CL de la acción luteolítica; es así que en el porcino, vacuno, ovino y equino se ha estudiado este mecanismo y ya se tienen precisiones al respecto (Bazer y Col., 1986), sin embargo en camélidos sudamericanos aún se desconoce.

En camélidos, con referencia a la implantación del embrión, se observó que casi en su totalidad se da en el cuerno uterino izquierdo, a pesar de no existir diferencia significativa en la actividad ovulatoria entre ambos ovarios; lo que indicaría que los embriones que se originan en el cuerno derecho tienen que migrar al lado izquierdo para su implantación (Fernández Baca y Col., 1973; Sumar, 1997).

Si bien no se conoce exactamente las razones de la migración, una explicación al respecto estaría en la actividad luteolítica diferencial de ambos cuernos uterinos, al ser sólo local en el derecho y además sistémica en el izquierdo (Fernández Baca y Col., 1979), por lo cual el embrión al implantarse en el cuerno izquierdo contrarrestaría su acción luteolítica

(Fernández Baca, 1993). La implantación del embrión en las paredes uterinas parece ocurrir dentro de los 21 días que siguen al servicio (Fernández Baca, 1971).

1.14. RECUPERACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

La transferencia de embriones (TE) ha pasado de ser, tras 20 años de aplicación práctica, un instrumento fiable en la cría animal de los últimos tiempos. Su realización se ha convertido en rutina diaria para los veterinarios y técnicos que trabajan en TE. La transferencia de embriones, junto con otras biotecnologías asociadas a ellas (conservación de embriones y de genes, fertilización *in vitro*, tipificación genética y transferencia genética) ha alcanzado una posición clave como tecnología básica en la reproducción y producción animal (Gorlach, 1999).

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, en el año 1999 se estableció un nuevo record. La utilización en el Perú de las biotecnologías reproductivas 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).

Resultados de estudios en superestimulación en ovarios y producción de embriones en llamas y alpacas se muestran en el Cuadro 1.1. Asimismo,

se presenta resultados de la técnica de transferencia de embriones durante los últimos 30 años en Sudamérica en el Cuadro 1.2.

Cuadro 1.1: Resultados de Superovulación en camélidos sudamericanos hasta la actualidad.

Especie	N° de animales	Estado fisiológico	Hormona	Embriones viables/ donadora	Referencia
Llama	6	Luteal (hCG)	eCG	2,3	Bourke y Adam 1992
Llama	24	Luteal (GnRh)	eCG	1,4	Bourke y Adam 1992
Llama	5	Luteal (CIDR)	eCG	2,0	Bourke y Adam 1992
Llama	17	Luteal (Norg.)	FSH	1,3	Bourke y Adam 1992
Llama	4	Luteal (Prog.)	eCG	0	Correa y Ratto 1994
Alpaca	4	Luteal (Prog.)	FSH	0	Correa y Ratto 1994
Llama	19	Luteal (GnRH)	eCG	1,6	Bourke y Col. 1995
Llama	17	Luteal (Norg.)	eCG	1,3	Bourke y Col. 1995
Llama	20	Receptiva	FSH	1,8	Correa y Col. 1997

Fuente: Adams y Ratto, 2001.

Cuadro 1.2: Resultados en transferencia de embriones en camélidos sudamericanos durante las tres últimas décadas.

País	Año	Especie	Número de donadoras	Número de receptoras	Número de Preñadas	Número de Nacidos
Perú	1968	Alpacas	3	3	-	-
Perú	1974	Alpacas	15	44	4	1
USA	1985	Llamas	2	2	1	1
Perú	1987	Alpacas	2	3	3	2
UK	1991	Llamas	33	11	3	2
Chile	1994	Llama	1	2	1	1
UK	1995	Llamas/ Guanacos	12	10	5	4
USA	2000	Llamas	47	-	15	-
USA	2001	Alpacas/ Llamas	-	-	-	2

Fuente: Adams y Ratto, 2001.

En un estudio de transferencia de embriones en camélidos, la recuperación de embriones se realizó a los 7 días después de la monta, mediante un método no quirúrgico, utilizando un catéter Foley de dos vías y una solución de Fosfato Buffer Salina (PBS) para el lavado de cada uno de los cuernos uterinos. Se recuperó el 76% de los embriones. El éxito del estudio fue determinado por la presencia de un embrión, observado por ecografía, a los 25 días después de la transferencia. Se logró un 42,8% (6/14) de hembras preñadas, resultados similares a lo reportado en bovinos, sin embargo, los resultados encontrados fueron muy satisfactorios, no sólo para el equipo de investigadores sino también por la importancia que puede

tener como una herramienta para el mejoramiento genético de los camélidos domésticos, a pesar de las condiciones poco favorables para realizar el estudio (Huanca y Col. 2006).

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 (Novoa y Sumar, 1968). La primera cría de alpaca nacida por transferencia de embriones fue obtenida por Sumar (Sumar y Franco, 1974). 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. 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 quirúrgica, similar a la descrita en vacunos (Wilson Wiepz y Chapman, 1985).

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 y que a los 7-8 días post inseminación ya se habría producido la eclosión de los embriones, es decir estarían fuera de la zona pelúcida. En estas condiciones los embriones podrían resultar dañados por las manipulaciones

realizadas durante el lavado y por lo tanto imposibilitar su recuperación (Novoa y Franco, 1999).

Las dificultades para establecer un procedimiento eficaz para estimular la respuesta ovárica en estas especies han llevado a algunos investigadores de EEUU y Australia a plantearse la recuperación de embriones a partir de hembras no estimuladas. Estos trabajos han permitido la recuperación de 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 41% (Taylor y Col., 2000).

1.15. CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS EMBRIONES

Los embriones seleccionados para la transferencia deben ser de la más alta calidad y encontrarse en una etapa adecuada de división. Se manipulan con técnicas estériles empleando un estereoscopio. En el Cuadro 1.3 se muestra la clasificación morfológica de embriones según los distintos grados de calidad (Hafez, 2000).

Cuadro 1.3: Clasificación y desarrollo de embriones.

Categoría	Tipo	Características
Clasificación de embriones	Excelente	Embrión con granulación uniforme, con simetría perfecta y contorno delineado. Ausencia de extrusión en el blastómero.
	Bueno	Embrión con granulación uniforme y contorno delineado. Algo de extrusión o degeneración en el blastómero. Forma hasta cierto punto asimétrico.
	Regular	Embrión intacto con contorno impreciso. Células con extrusión. Blastómeros degenerados.
	Pobre	Embrión con granulación desigual o contorno impreciso. Algo de extrusión o degeneración en el blastómero. Forma anormal.
	Degenerado	Etapa de desarrollo difícil de determinar.
Desarrollo embrionario	Mórula	Los blastómeros individuales no se identifican. El embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.
	Mórula compacta	Los blastómeros individuales se agregan y forman una masa embrionaria compacta.
	Blastocisto temprano	Embrión con cavidad llena de líquido o blastocele. Embrión ocupa tres cuartas partes del espacio perivitelino. Es posible diferenciar el trofoblasto de la masa celular interna.

Cuadro 1.3: Clasificación y desarrollo de embriones (...Continuación).

Categoría	Tipo	Características
Desarrollo embrionario	Blastocisto medio	Diferenciación pronunciada del trofoblasto externo. Masa celular interna compacta y más oscura. Blastocisto muy prominente y el embrión ocupa casi todo el espacio perivitelino.
	Blastocisto expandido	El embrión tiene tamaño notablemente grande.
	Blastocisto en liberación	Embrión en proceso de formación.
	Blastocisto expandido en liberación	Embrión con reexpansión y blastocisto grande. Circular, muy frágil y alargado en las fases tardías.

Fuente: Hafez, 2000.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. LUGAR DE ESTUDIO

El presente trabajo de investigación se realizó en la Estación Experimental Agraria Canaán del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) – Ayacucho, ubicado en la Av. Abancay s/n, Canaán Bajo, distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, región Ayacucho; con una altura de 2735 m.s.n.m., latitud sur 13°10'09", longitud oeste 74°12'82".

Las características climáticas registradas del área de influencia de la Estación Experimental Agraria Canaán indican que la temperatura varía de 12 a 18°C y la precipitación pluvial varía de 250 – 500 mm.

Fuente: Estación meteorológica de la E.E.A. Canaán - INIA - Ayacucho.

2.2. DURACIÓN DEL TRABAJO

La duración del trabajo desde la revisión de la bibliografía hasta la entrega del primer borrador fue de 10 meses. De los cuales la duración de la fase experimental fue de 3 meses, entre Marzo y Mayo del 2011.

2.3. MATERIALES

2.3.1. Materiales biológicos

Los materiales biológicos disponibles fueron: diez (10) alpacas hembras de la raza Huacaya, cuyas edades fluctuaban entre 4 y 6 años; y cuatro (04) alpacas machos de la raza Huacaya, cuyas edades fluctuaban entre 4 y 5 años, los cuales se encontraban en el periodo reproductivo.

2.3.2. Materiales no biológicos

La Estación Experimental Agraria Canaán del INIA - Ayacucho, cuenta con un corral para el alojamiento de las alpacas y también con un Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Asistida equipado.

Los equipos, materiales y medios que se utilizaron para realizar el presente trabajo fueron:

a) Equipos

- Ecógrafo Marca Landwind con transductor lineal de 7.5 MHz
- Estereoscopio
- Autoclave
- Baño María

- Estufa

b) Materiales de laboratorio

- Catéter Foley N° 18 de doble vía
- Estilete de aluminio
- Filtro EMCOM
- Probeta 1000 ml
- Matraz de 1000 ml
- Vasos de precipitado de 500 ml
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Placas Petri medianas y grandes
- Lubricante: jabón líquido
- Gel para ecografía
- Guantes quirúrgicos
- Guantes obstétricos
- Papel toalla
- Cinta maskingtape
- Gasas
- Jeringas de 1, 5 y 60 ml
- Aguja hipodérmica N° 21
- Alcohol por 1 Litro
- Algodón por 1 Kg.

c) Materiales de campo

- Carretilla para sujeción del animal

- Sogas
- Bozal
- Fichas individuales (actividad ovárica y otras observaciones).

d) Medios para el lavado y preservación de embriones

- Medio de lavado completo BioLife Advantage (Agtech, Inc.), bolsa de 1 litro.

Fórmula: D-PBS (1x líquido) con D-glucosa, piruvato sódico, PVOH (alcohol polivinílico), gentamicina y kanamicina.

- Medio de preservación y transferencia de embriones BioLife (Agtech, Inc.), bolsa de 60 ml.

Fórmula: M-PBS con 4 mg de ASB (albúmina sérica bovina) fr. V, 100 ug de estreptomina, 0,25 ug de anfotericina-B y 0,02 mg de kanamicina/ml. Sin rojo de fenol.

e) Anestésico local y tranquilizante

- Lidocaína clorhidrato 2%
- Frasco de Promazil® (Acepromazina)

2.4. ETAPAS Y TÉCNICAS

2.4.1. Selección y preparación de los animales

Las 10 alpacas hembras adultas de la raza Huacaya en condición no gestante, fueron seleccionadas al azar del Banco de Germoplasma del INIA Ayacucho, ubicado en la comunidad de Ccarhuaccpampa, distrito de Paras, provincia de Cangallo, región Ayacucho, ubicado a

4200 msnm. Para el diagnóstico de preñez se utilizó una prueba de campo que consistió en la exposición de la hembra al macho y si ésta tomaba la posición de recumbencia (de cúbito ventral) mostrando una actitud de aceptación, significaba que muy probablemente estaba vacía y era seleccionada, posteriormente se confirmó con el examen ultrasonográfico.

Las 4 alpacas adultos machos fueron seleccionados de aquellos que habían trabajado en la campaña anterior, es decir machos probados con descendencia conocida.

La preparación de los animales consistió en un proceso de acostumbramiento a su nuevo hábitat un mes antes de iniciar con el trabajo y la aplicación de un antiparasitario (Valbazen plus®) y de un suplemento vitamínico (Vigantol® ADE) quince días antes de llevar a cabo el presente trabajo, con la finalidad de que los animales tengan una buena condición corporal.

2.4.2. Ecografía y empadre

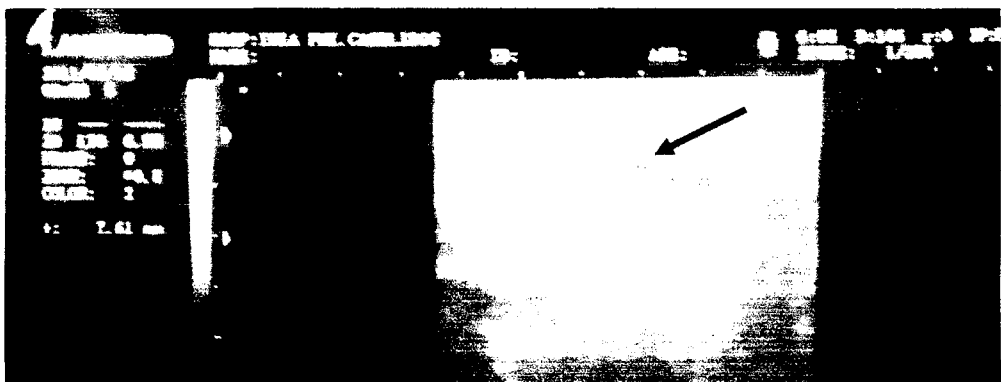


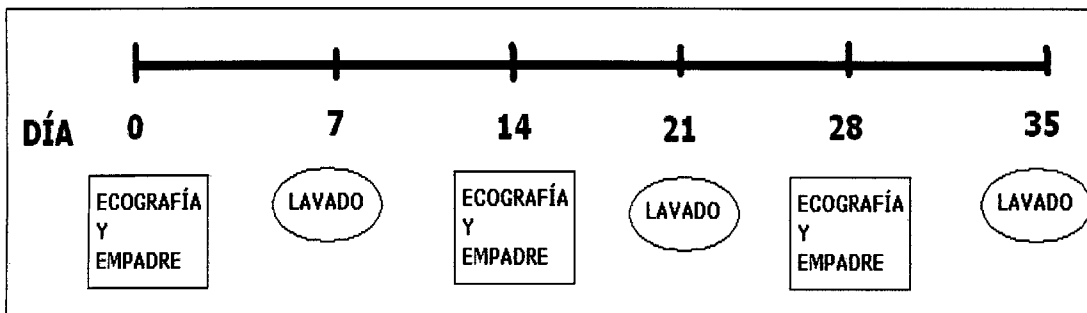
Imagen N° 01: Ecografía transrectal ovárica de una alpaca Huacaya donadora natural, se observa un folículo de 7.61 mm de diámetro.

En el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Asistida de la Estación Experimental Canaán, se realizó el primer día (considerado día 0) la evaluación folicular de las alpacas Huacaya seleccionadas, mediante la técnica de ultrasonografía transrectal utilizando un ecógrafo veterinario marca Landwind con un transductor lineal de 7.5 MHz, para verificar la presencia de un folículo preovulatorio ($\geq 7\text{mm}$ de diámetro), las alpacas que presentaron este folículo fueron trasladadas a su corral, donde se realizó el empadre dirigido con los respectivos machos. Es importante recalcar que no se suministró ninguna hormona exógena para inducir la ovulación en las alpacas. El día del primer empadre se consideró como el día cero (0).



Imagen N° 02: Empadre dirigido de alpacas Huacaya donadoras naturales que presentaron folículo preovulatorio.

Esquema 2.1. Procedimiento para la recuperación sucesiva de embriones y retorno folicular post lavado en alpacas (*Vicugna pacos*) Huacaya, donadoras naturales.



Fuente: Elaboración propia.

2.4.3. Recuperación de embriones (Lavado intrauterino)

Transcurridos siete días luego del empadre (es decir el día 7, 21 ó 35, dependiendo si se realizó 1, 2 ó 3 lavados, respectivamente), se procedió a la recuperación del embrión, mediante un procedimiento no quirúrgico, previa identificación, mediante ecografía, del cuerpo lúteo en el ovario respectivo donde 7 días atrás se observó el folículo preovulatorio.

En el corral de alpacas se inmovilizó al animal en una carretilla diseñada para su sujeción con la ayuda de sogas y un bozal, luego se trasladó hacia la "zona de manejo animal" del laboratorio donde se le administró 0,3 ml de Promazil® (Acepromazina) vía intramuscular, para su tranquilización, y también se le aplicó 0.5 ml de Lidocaína 2% en la articulación sacrococcígea, esto con el objeto de conseguir la anestesia epidural caudal, a continuación se procedió a la eliminación del contenido rectal con la ayuda de un par de guantes quirúrgicos y el

lubricante, después se realizó la ecografía transrectal para observar el ovario en busca del cuerpo lúteo.

Para una mejor limpieza de la región perineal, ésta se lavó con agua y jabón, luego se secó con papel toalla.

El cuerno uterino elegido para el lavado, fue el del mismo lado del ovario en el que se encontró el cuerpo lúteo (indicativo de que ocurrió la ovulación), se utilizó un catéter Foley de doble vía N° 18. Se introdujo vía transvaginal el catéter Foley, atravesando la cérvix hasta llegar al tercio anterior del cuerno uterino, luego se procedió al insuflado del balón del catéter con 15 ml de aire.



Imagen N° 03: Introducción del catéter Foley N° 18, atravesando la cérvix hasta llegar al tercio anterior del cuerno uterino.

El lavado se realizó con el medio de lavado de la marca Agtech (Anexo 01), previamente calentado a una temperatura de 37°C en Baño María. El cuerno uterino fue lavado con 30 ml de medio de lavado, ingresando cantidades de 10 ml, por tres veces consecutivas con una jeringa de 60 ml. El medio de lavado recuperado desde el cuerno uterino fue pasado a través de un filtro EMCOM (que posee un diámetro de poro de 70 μm) (Anexo 02), finalizado el lavado, se utilizó 5 ml adicionales de medio de lavado para recuperar el contenido remanente dentro del catéter, drenado a una placa petri, inmediatamente después los contenidos del medio de lavado recuperado del cuerno uterino fueron trasladado a la “zona restringida” del laboratorio, donde fue observado a través del estereoscopio para proceder a la búsqueda del embrión.

2.4.4. Evaluación de los embriones

En la “zona restringida” del laboratorio, los embriones recuperados fueron llevados al medio de mantenimiento (Anexo 03), luego se evaluaron y clasificaron según los criterios que se muestran en el Cuadro 1.3, mediante el uso del estereoscopio (Anexos 04, 05, 06 y 07).

2.4.5. Tiempo de retorno folicular post-lavado

Para la evaluación del tiempo de retorno folicular, se utilizó ecografía transrectal en dos momentos: primero el día 14, es decir transcurridos 7 días después del primer lavado; y segundo el día 28, transcurridos 7 días después del segundo lavado sucesivo; ello con el

objeto de observar el ovario en busca de algún folículo pre ovulatorio ($\geq 7\text{mm}$), el cual nos indicaría que el ovario se encuentra desarrollando una nueva onda folicular, y si éste era el caso se procedía al empadre de la alpaca.

Cada acontecimiento sucedido con cada alpaca, durante este trabajo de investigación, fue registrado en una ficha individual (Anexo 08).

De acuerdo al desarrollo del trabajo, se formaron 3 grupos de alpacas a las cuales, de acuerdo al número de lavados sucesivos, se denominó de la siguiente manera:

- **Primero:** alpacas al primer lavado sin retorno folicular.
- **Segundo:** alpacas al segundo lavado sucesivo y que tuvieron 1 retorno folicular post lavado.
- **Tercero:** alpacas al tercer lavado sucesivo y que tuvieron 2 retornos foliculares post lavado.

2.5. DISEÑO ESTADÍSTICO

Se utilizó estadística descriptiva básica como medidas de tendencia central (promedio) y de dispersión (desviación estándar, coeficiente de variabilidad y mínimo y máximo), asimismo se muestran frecuencias absolutas y relativas.

Para analizar las variables cuantitativas: tamaño de folículos y tamaño de cuerpos lúteos comparados de acuerdo al número de lavados, se utilizó

un Diseño Completamente al Azar (DCA) cuyo Modelo Aditivo Lineal (MAL) es:

$$y_{ij} = u + P_i + e_{ijk}$$

Donde:

y_{ij} = Es la variable respuesta (tamaño de folículos y de cuerpos lúteos).

u = Es el promedio general o constante común.

P_i = Es el factor número de lavado (01, 02 y 03 Lavados).

e_{ijk} = Es el error experimental.

Para las comparaciones múltiples se utilizó la Prueba de Duncan.

Las variables continuas: porcentaje de folículos y cuerpos lúteos según lado de ovario, tasa de ovulación según número de lavado y lado de ovario, tasa de recuperación de embriones según número de lavado y lado de cuerno uterino, porcentaje de embriones según calidad, y tiempo de retorno folicular, fueron analizados mediante la prueba de Chi-cuadrado (de muestras simples) cuya fórmula es la siguiente:

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

Donde:

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.

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 analizar las variables continuas (tamaño de folículos y tamaño de cuerpos lúteos según lado de ovario) se utilizó la prueba T-Student, cuya fórmula es:

$$t_c = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{S_p^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \approx t_{(n_1+n_2-2)gl}$$

Donde:

t_c = Es la t calculada.

\bar{X}_1 y \bar{X}_2 = es el promedio del lado de ovario derecho e izquierdo.

S_p^2 = es la variancia común.

n_1 y n_2 = son el número de observaciones del lado de ovario derecho e izquierdo.

Los datos fueron procesados mediante el programa estadístico R versión 2.5.1.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA

3.1.1. Evaluación de folículos preovulatorios

Cuadro 3.1: Número y diámetro folicular (mm) al día de la ecografía según número de lavados sucesivos en alpacas Huacaya donadoras naturales. E.E.A. Canaán-INIA, Ayacucho-2011.

Nº de Lavados sucesivos	Nº de alpacas	Folículos ováricos				
		Nº	Diámetro promedio (mm) ± D.S.	C.V. %	Mínimo (mm)	Máximo (mm)
Primero	10	10	8.00 ± 1.15 ^a	14.43	7.00	10.00
Segundo	5/10	5	9.20 ± 2.86 ^a	31.13	7.00	14.00
Tercero	2/5	2	7.50 ± 0.71 ^a	9.43	7.00	8.00
Total general	10	17	8.29 ± 1.79	21.64	7.00	14.00

a, b. Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (P<0.05), Prueba Duncan.

En el cuadro 3.1 se muestra los resultados sobre el número y diámetro promedio de folículos preovulatorios ($\geq 7\text{mm}$) en alpacas Huacaya donadoras naturales según número de lavados sucesivos; en el cual, el diámetro folicular al día de la ecografía presenta un promedio general de $8.29 \pm 1.79\text{mm}$, con un coeficiente de variabilidad de 21.64%, con valores que van de 7 a 14mm; al 1º Lavado se tuvo un diámetro promedio de $8.00 \pm 1.15\text{mm}$; al 2º, $9.20 \pm 2.86\text{mm}$ y al 3º, $7.50 \pm 0.71\text{mm}$. Al análisis estadístico nos indica que no existe diferencia estadística significativa entre los diámetros promedios según número de lavados sucesivos. ($P \geq 0.05$) (Anexo 09).

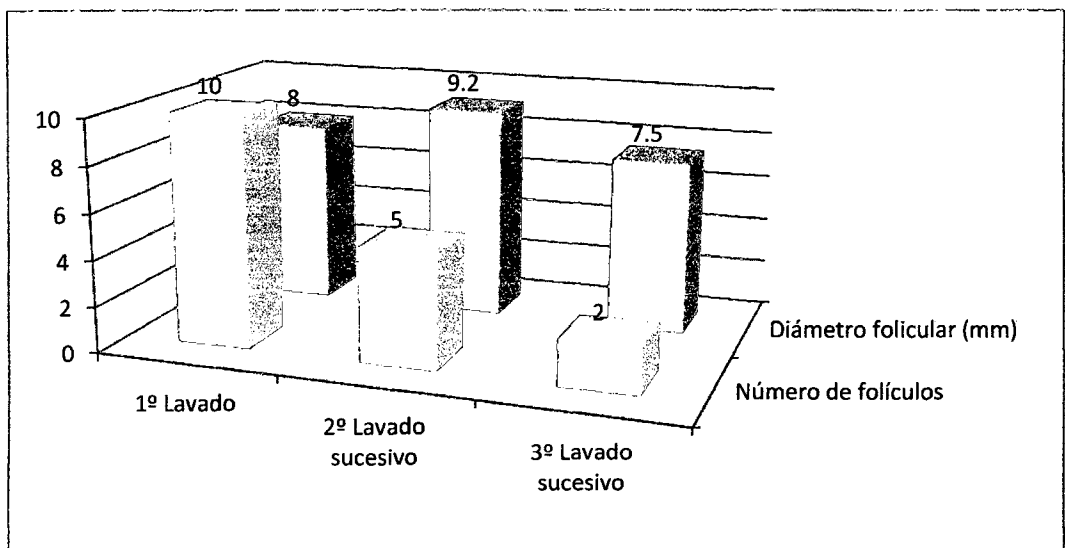


Gráfico 3.1: Número y diámetro folicular (mm) al día 0 según número de lavados sucesivos en alpacas Huacaya donadoras naturales.

Al respecto Bravo y Col. (1990), señala que la ovulación de un folículo se produce cuando el folículo adquiere un diámetro mayor o igual a 7mm (preovulatorio) y que si el estímulo para inducir la ovulación se da cuando el

folículo se encuentra en etapa de crecimiento; en nuestro estudio el diámetro promedio fue de 8 mm lo que demostró la presencia de dinámica folicular.

Cuadro 3.2: Diámetro folicular promedio (mm) y porcentaje de folículos al día de la ecografía, según ubicación del ovario en alpacas Huacaya donadoras naturales. E.E.A. Canaán-INIA, Ayacucho-2011.

Ovario	Folículos ováricos					
	Nº	(%)	Diámetro promedio (mm) ± D.S.	C.V. %	Mínimo (mm)	Máximo (mm)
Derecho	11	64.71	7.82 ± 1.08 ^a	13.80	7.00	10.00
Izquierdo	6	35.29	9.17 ± 2.56 ^a	27.96	7.00	14.00

a, b. Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$), Prueba t-student.

El cuadro 3.2 muestra el diámetro folicular promedio (mm) y porcentaje de folículos por ovario al día de la ecografía, en alpacas Huacaya donadoras naturales; siendo para el ovario derecho de 7.82 ± 1.08 mm y ovario izquierdo de 9.17 ± 2.56 mm. Al análisis estadístico, no existe diferencia estadística significativa entre los tamaños promedios de folículos según ovario de la alpaca ($P \geq 0.05$) (Anexo 10).

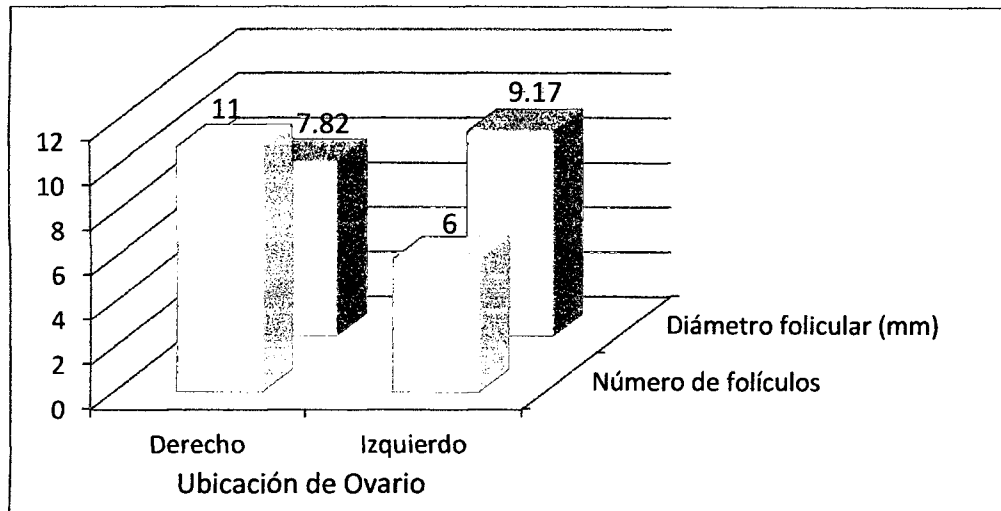


Gráfico 3.2: Diámetro folicular (mm) y porcentaje de folículos por ovario al día cero en alpacas Huacaya donadoras naturales.

Con respecto al diámetro del folículo preovulatorio al momento de la cópula fue similar para todos los grupos siendo superior o igual a 7 mm, lo cual es similar a lo reportado por Cervantes (2008) y Panez (2007).

No existen trabajos previos sobre diámetros foliculares en alpacas según ubicación del ovario; sin embargo Jiménez (2009) al trabajar en Puno, con una muestra de 32 llamas donadoras, reportó el diámetro de folículos del ovario derecho de $9.55 \pm 3.12\text{mm}$ y para el izquierdo $9.87 \pm 2.92\text{mm}$ que al análisis estadístico no existe diferencia estadística significativa ($P \geq 0.05$). Además, dichos resultados demuestran que esta especie presenta valores ligeramente mayores, a lo que nosotros podemos aducir que probablemente se debió a la mayor condición corporal y tamaño de los animales, así como por la propia especie en relación a nuestro trabajo de investigación.

De la misma manera, hace suponer que en un procedimiento sin superestimulación siempre se van a obtener porcentajes similares a los que

se observa en una cópula normal con una frecuencia similar de aparición de folículos, tanto en el ovario derecho como en el izquierdo, lo que coincide con algunos autores, que observaron que los folículos dominantes se distribuyen en forma homogénea entre ambos ovarios (Bravo y Sumar, 1989; Fernández Baca y Col., 1970; San Martín y Col., 1968).

En cuanto al porcentaje de folículos, el ovario derecho desarrolló un 64.71% (11/17) de folículos en comparación al izquierdo que sólo presentó un 35.29% (6/17). Al análisis estadístico, nos indica que este porcentaje es similar o que la funcionalidad ovárica es igual en ambos ovarios ($P \geq 0.05$).

Nuestro resultado se asemeja a los obtenidos por Jiménez (2009), en un trabajo realizado con llamas, en el que obtuvo 35 folículos, de los cuales el 57.14% fueron del ovario derecho y 42.86% del ovario izquierdo, al análisis estadístico no existió asociación estadística según ubicación de ovario ($P \geq 0.05$), mostrando ambas especies una mayor actividad folicular en el ovario derecho, resultados sin embargo que contrastan con Del Campo y Col. (1996) y Cosio (2000) quienes indican que el porcentaje de folículos en el ovario izquierdo es ligeramente superior que en el derecho.

3.1.2. Evaluación de cuerpos lúteos

Cuadro 3.3: Número y diámetro promedio de cuerpos lúteos (mm), según número de lavados sucesivos en alpacas Huacaya donadoras naturales. E.E.A. Canaán-INIA, Ayacucho-2011.

Nº de Lavados sucesivos	Nº de alpacas	Cuerpos lúteos				
		Nº	Diámetro promedio (mm) ± D.S.	C.V. %	Mín. (mm)	Máx. (mm)
Primero	10	7	12.00 ± 1.83 ^a	15.21	9	14
Segundo	5/10	4	11.00 ± 0.82 ^a	7.42	10	12
Tercero	2/5	2	11.50 ± 0.71 ^a	6.15	11	12
Total general	10	13	11.62 ± 1.45	12.45	9.00	14

a, b. Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$), Prueba Duncan.

En el cuadro 3.3 se muestra el diámetro promedio de cuerpos lúteos (mm) según número de lavados sucesivos, en alpacas Huacaya donadoras naturales, siendo el diámetro general promedio de 11.62 ± 1.45 mm. Para los lavados 1º, 2º y 3º, el diámetro promedio de los cuerpos lúteos fue de 12.00 ± 1.83 mm; 11.00 ± 0.82 mm; y 11.50 ± 0.71 mm, respectivamente. Al análisis estadístico, las diferencias de los promedios de los tres lavados sucesivos no es significativo ($P \geq 0.05$) (Anexo 11). El tamaño folicular no está influenciado por el número de lavados sucesivos instaurados en las alpacas, el cual generaría un estrés por el procedimiento ejecutado. El diámetro de los cuerpos lúteos se encuentra dentro de los rangos (10 - 15 mm) que asegurarán la producción de progesterona en caso prosiguiera la gestación, logrando su máximo desarrollo entre los 8 días post cópula como lo menciona Aba y Col. (2000) y Adams y Col. (1991).

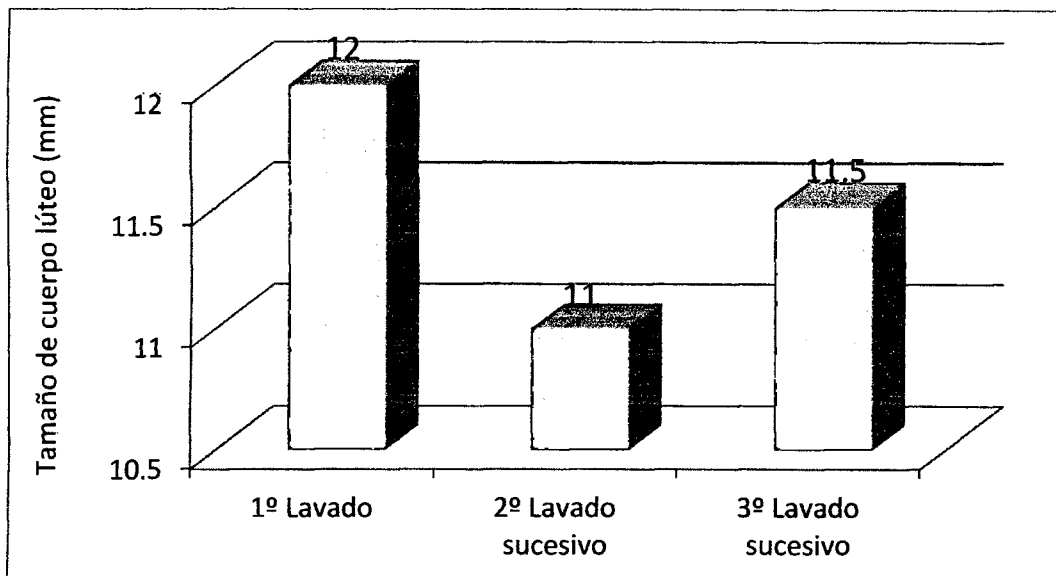


Gráfico 3.3: Diámetro de cuerpos lúteos (mm) según número de lavados sucesivos, en alpacas Huacaya donadoras naturales.

Existen otros trabajos donde se utilizaron inductores de la ovulación. Así, Vásquez (2005), quien utilizando plasma seminal entero obtuvo cuerpos lúteos con diámetro de 10.9 ± 2.7 mm; así mismo, en otro estudio Panéz (2007) obtuvo cuerpos lúteos con un diámetro de 9.5 ± 1.1 mm al utilizar plasma seminal por vía intramuscular. Coincidimos también con Sumar y Col. (1988), quien reportó que el cuerpo lúteo crece rápidamente de 7 mm de diámetro para el día 3 post monta a 10 - 12 mm para el día 7 a 8 después del servicio.

Cuadro 3.4: Diámetro promedio y número de cuerpos lúteos, según ovario, en alpacas Huacaya donadoras naturales. E.E.A. Canaán-INIA, Ayacucho-2011.

Ovario	Cuerpos lúteos					
	Nº	(%)	Diámetro promedio (mm) ± D.S.	C.V. %	Mínimo (mm)	Máximo (mm)
Derecho	9	69.23	11.67 ± 1.66	14.21	9	14
Izquierdo	4	30.77	11.50 ± 1.00	8.70	11	13

a, b Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$), Prueba t-student.

El cuadro 3.4 indica el tamaño promedio de los cuerpos lúteos según ubicación del ovario en alpacas Huacaya donadoras naturales. Los cuerpos lúteos del ovario derecho lograron tamaños promedio de 11.67 ± 1.66 mm y el ovario izquierdo 11.50 ± 1.00 mm de diámetro. Al análisis estadístico esta diferencia no es significativa ($P \geq 0.05$) (Anexo 12).

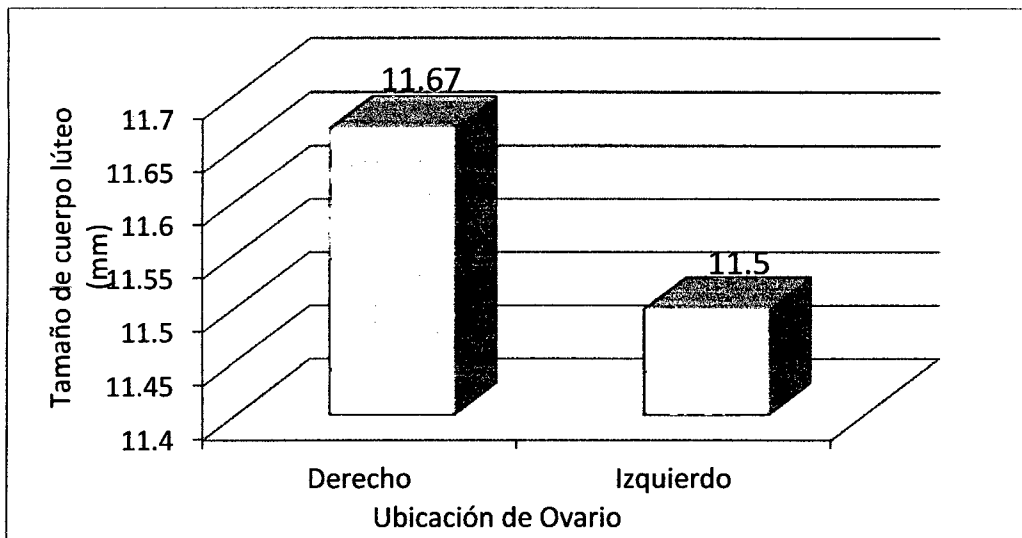


Gráfico 3.4: Diámetro promedio de cuerpos lúteos según ovario, en alpacas Huacaya donadoras naturales.

En el presente estudio el cuerpo lúteo fue detectado al día 7 post cópula mediante ecografía transrectal ovárica; sin embargo, se tiene referencias de Adams y Col. (1991) en llamas no preñadas que ovularon, detectándose tempranamente el cuerpo lúteo a los 3.1 ± 0.2 días post ovulación y el crecimiento máximo se dio a los 5.9 ± 0.3 días post ovulación.

Cuadro 3.5: Tasa de ovulación general según número de lavados sucesivos en alpacas Huacaya donadoras naturales. E.E.A. Canaán-INIA, Ayacucho-2011.

Nº de Lavados sucesivos	Respuesta ovulatoria en alpacas				Total de alpacas	
	Sin ovulación		Con ovulación			
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	%
Primero	3	30.00	7	70.00	10	100.00
Segundo	1	20.00	4	80.00	5/10	100.00
Tercero	0	0.00	2	100.00	2/5	100.00
Total general	4	23.53	13	76.47	10	100.00

En el cuadro 3.5 se presentan las tasas de ovulación, general y según número de lavados sucesivos en alpacas Huacaya donadoras naturales, siendo la tasa de ovulación global de 76.47% (13/17) de los folículos preovulatorios identificados con anterioridad y un 23.53% (4/17) de folículos que no ovularon. Además indica que la tasa de ovulación para el 1º Lavado fue 70% (7/10), 2º Lavado sucesivo, 80% (4/5) y 3º Lavado sucesivo, 100% (2/2). Al análisis estadístico podemos afirmar que la tasa de ovulación en cada uno de los lavados tiene un comportamiento diferente ($P < 0.01$) (Anexo 13).

La presencia del cuerpo lúteo confirma la ovulación después de la cópula o la administración de hormonas con actividad LH como lo mencionan Bravo y Col. (1990); Fernández Baca y Col. (1970).

El 76.47% (13/17) de las hembras presentaron un solo cuerpo lúteo ya que en cada onda folicular en condiciones naturales sólo un folículo se hace dominante y otras de la cohorte se atrofian; a diferencia de lo que ocurre en los tratamientos superovulatorios como en el trabajo presentado por Huanca y Col. (2006, 2007) en el que reporta que utilizando un protocolo hormonal de estimulación ovárica con eCG, es posible obtener el desarrollo de 8.1 ± 1.0 cuerpos lúteos en llamas y 5.9 ± 1.3 cuerpos lúteos en alpacas.

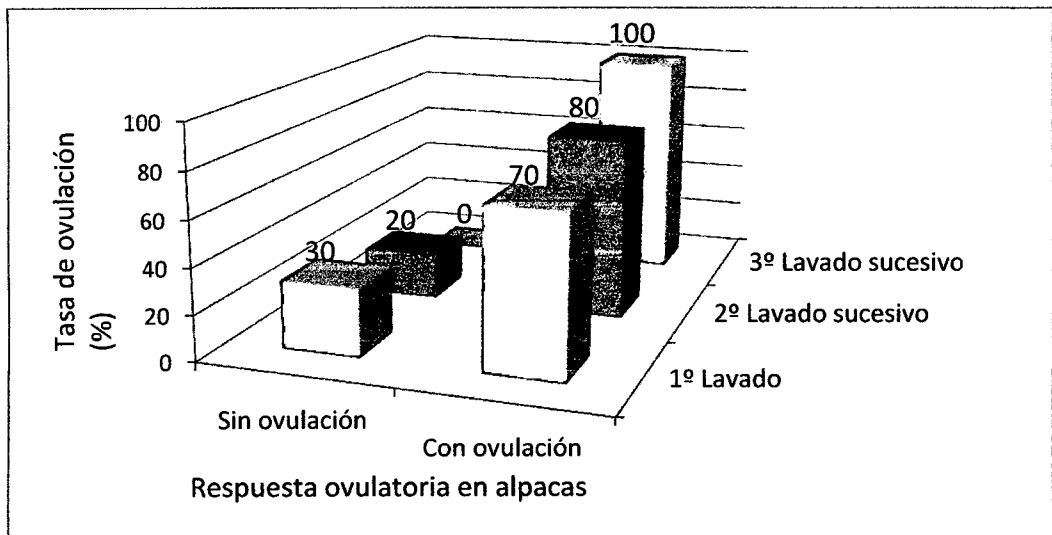


Gráfico 3.5: Tasa de ovulación según número de lavados sucesivos en alpacas Huacaya donadoras naturales.

Las fallas de la ovulación post cópula pueden ser atribuidas a una sensibilidad disminuida de los folículos a los niveles circulantes de LH debido a las variaciones en los estadios de maduración folicular como lo menciona Fernández Baca (1971) y Novoa (1989) o también podrían deberse al tiempo

de la cópula, no siendo el principal factor como lo menciona Vivanco y Col. (1985) al referirse 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 de cópula no llegan a ovular mientras que en otras con 5 minutos si lo hacen.

Cuadro 3.6: Tasa de ovulación según ovario en alpacas Huacaya donadoras naturales. E.E.A. Canaán-INIA, Ayacucho-2011.

Ovario	Respuesta ovulatoria en alpacas Huacaya				Total general	
	Sin ovulación		Con ovulación			
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
Derecho	2	18.18	9	81.82	11	100
Izquierdo	2	33.33	4	66.67	6	100
Total general	4	23.53	13	76.47	17	100

En el cuadro 3.6 se muestra la tasa de ovulación según ovario en alpacas Huacaya donadoras naturales, siendo para el ovario derecho 81.82% (9/11) e izquierdo 66.67% (4/6). Estos resultados corresponden al total de folículos preovulatorios y cuerpos lúteos logrados en los tres procedimientos en general. Al análisis estadístico no existe diferencia estadística ($P \geq 0.05$) por lo que la tasa de ovulación del ovario derecho e izquierdo son similares (Anexo 14).

Según Fernández Baca (1973) en un estudio en alpacas, no se encontraron diferencias en la tasa de ovulación entre ovarios, detectando un cuerpo lúteo en el ovario derecho en 51%, 47% en el izquierdo y cerca de 2% en ambos.

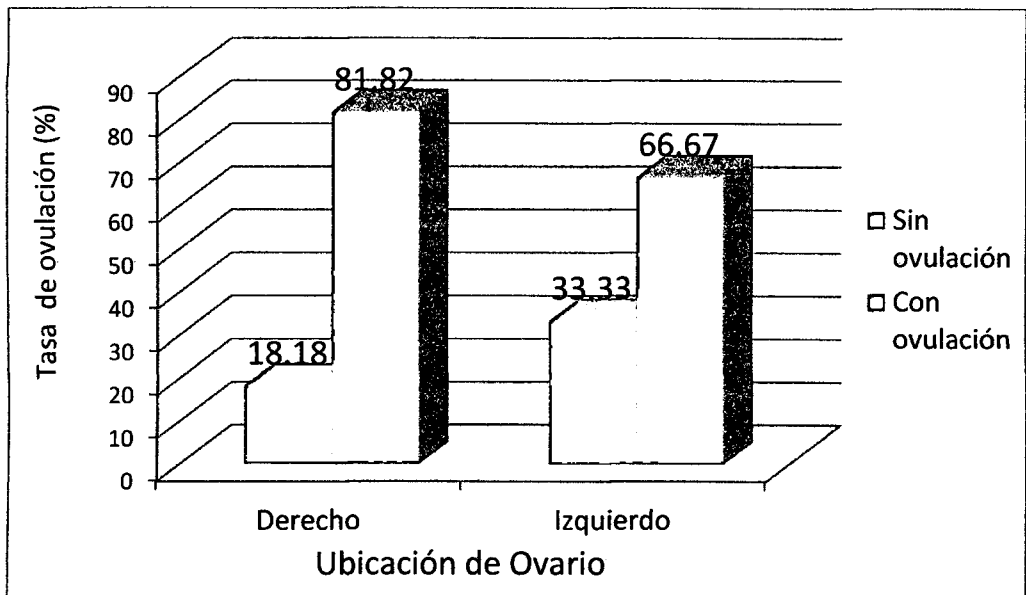


Gráfico 3.6: Tasa de ovulación según ovario en alpacas Huacaya donadoras naturales.

Para el caso de llamas, Sumar y Leyva (1979) detectaron un cuerpo lúteo en el ovario derecho en un 55%, 44% en el izquierdo y 1% en ambos ovarios, no existiendo diferencia significativa entre ovarios.

3.2. EVALUACIÓN DE EMBRIONES RECUPERADOS

Cuadro 3.7: Tasa de recuperación de embriones en función del número de cuerpos lúteos según número de lavados sucesivos en alpacas Huacaya donadoras naturales. E.E.A. Canaán-INIA, Ayacucho-2011.

Nº de Lavados sucesivos	Nº alpacas	Nº cuerpos lúteos	Embriones recuperados	
			Nº	(%)
Primero	10	7	3	43
Segundo	5/10	4	3	75.00
Tercero	2/10	2	2	100.00
Total general	10	13	8	61.54

El cuadro 3.7 indica la tasa de recuperación de embriones en función del número de cuerpos lúteos identificados según número de lavados sucesivos en alpacas Huacaya donadoras naturales. El promedio general de embriones recuperados fue de 61.54% (8/13) de un total de 13 cuerpos lúteos identificados por evaluación ecográfica. El 100% de los embriones se encontraron en estado de blastocisto expandido.

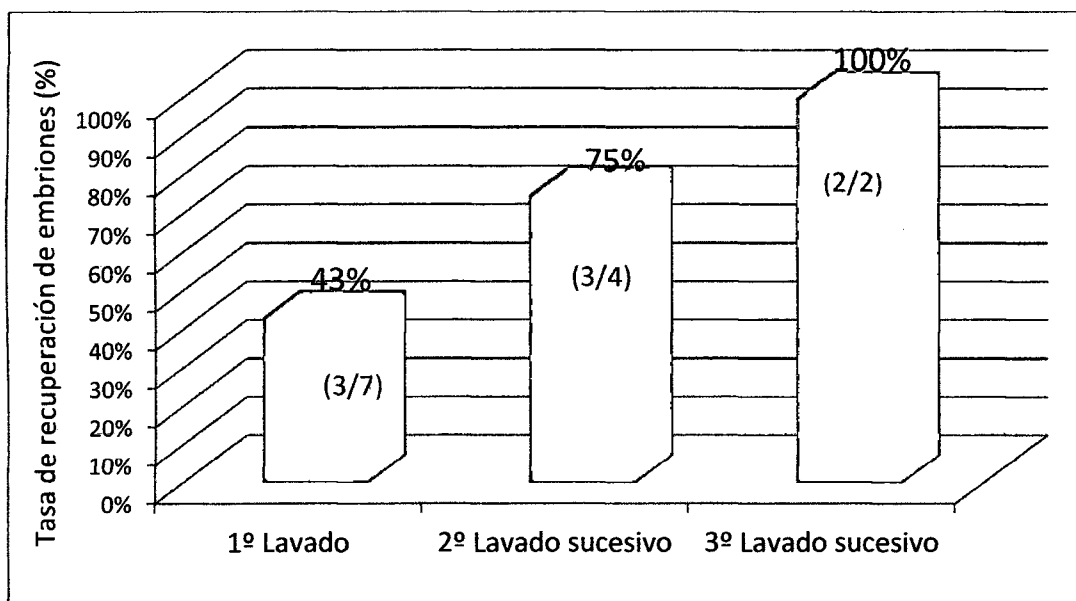


Gráfico 3.7: Tasa de recuperación de embriones en función del número de cuerpos lúteos según número de lavados sucesivos en alpacas Huacaya donadoras naturales.

El gráfico 3.7 muestra la tasa de recuperación de embriones para el 1º, 2º y 3º Lavado sucesivo, cuyos valores son 42.86% (3/7), 75% (3/4) y 100% (2/2) respectivamente. Al análisis estadístico podemos afirmar que la tasa de recuperación de embriones tiene un comportamiento diferente en función del número de cuerpos lúteos según número de lavados ($P \geq 0.01$). (Anexo 15).

Cuadro 3.8: Tasa de recuperación de embriones en función del cuerno uterino y número de cuerpos lúteos en alpacas Huacaya donadoras naturales. E.E.A. Canaán-INIA, Ayacucho-2011.

Cuerno uterino	Nº cuerpos lúteos	Embriones recuperados	
		Nº	(%)
Derecho	9	5	55.56
Izquierdo	4	3	75.00
Total general	13	8	61.54

El cuadro 3.8 muestra la tasa de recuperación de embriones en función del cuerno uterino y el número de cuerpos lúteos en alpacas Huacaya donadoras naturales, siendo para el cuerno uterino derecho 55.56% (5/9) embriones y para el izquierdo 75% (3/4) embriones en estado de blastocisto. Al análisis estadístico no hay diferencia significativa ($P \geq 0.05$) (Anexo 16).

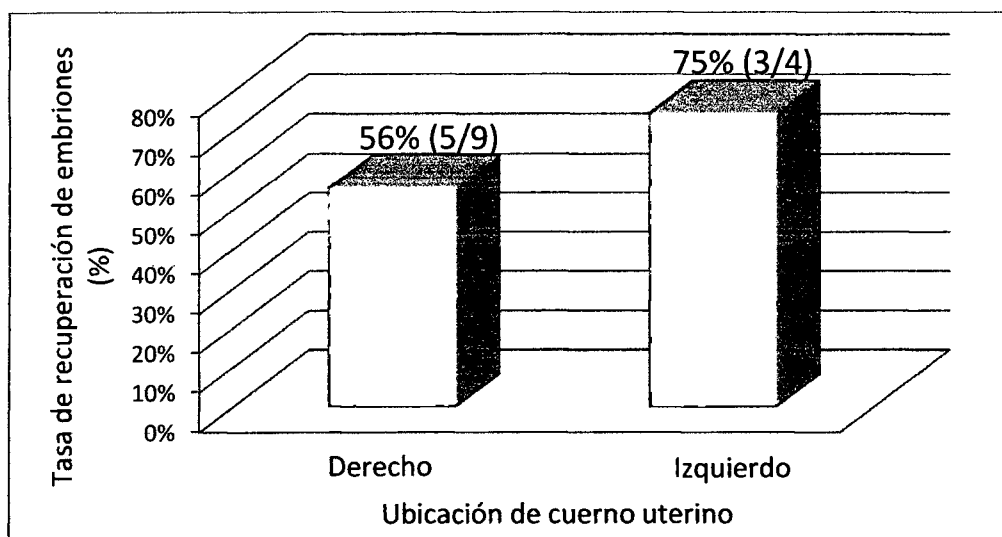


Gráfico 3.8: Tasa de recuperación de embriones en función del cuerno uterino y número de cuerpos lúteos en alpacas Huacaya donadoras naturales.

Por otra parte, nuestras cifras son un tanto diferentes con respecto a Cosio (2000), quien reporta que sobre 21 hembras que presentaron cuerpos lúteos y que no fueron tratadas por superestimulación, se encontró un total de 16 embriones, de los cuales el 31.25% fueron recolectados del lado derecho y 68,95% del lado izquierdo, pero coincidimos en que el mayor porcentaje de embriones se recuperó del cuerno uterino izquierdo.

Cuadro 3.9: Tasa de recuperación de embriones según número de lavados sucesivos y ubicación en el cuerno uterino (Blastocisto = 100%) en alpacas Huacaya donadoras naturales. E.E.A. Canaán-INIA, Ayacucho-2011.

N° de Lavados sucesivos	Cuerno uterino	Embriones recuperados		Tasa recuperación embriones (%)
		Cantidad	Sub total	
Primero	Derecho	2	3	66.6
	Izquierdo	1		33.3
Primero	Derecho	1	3	33.3
	Izquierdo	2		66.6
Tercero	Derecho	2	2	100.00

El cuadro 3.9 muestra la tasa de recuperación de embriones según número de lavados sucesivos y ubicación en el cuerno uterino en alpacas Huacaya donadoras naturales; siendo para el 1º Lavado el 66.6% (2/3) de embriones procedentes del cuerno derecho y 33.3% (1/3), del cuerno izquierdo; para el 2º Lavado sucesivo, el 33.3% (1/3) de embriones procedían del cuerno uterino derecho y 66.3% (2/3), del cuerno izquierdo y

para el 3º Lavado sucesivo, el 100% (2/2) de embriones procedieron sólo del cuerno derecho.

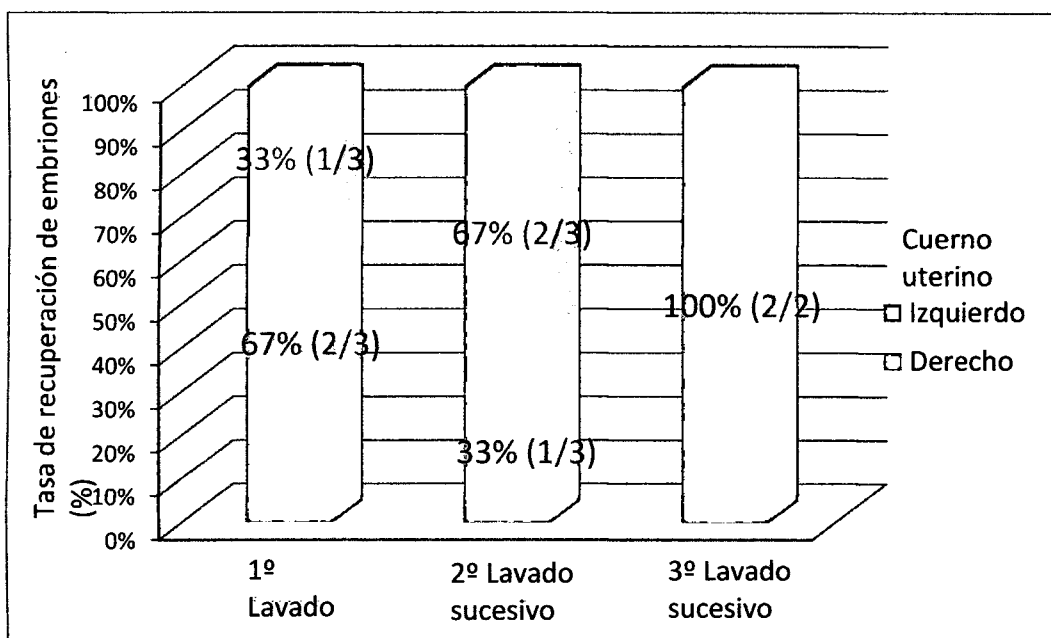


Gráfico 3.9: Tasa de recuperación de embriones según número de lavados sucesivos y ubicación en el cuerno uterino (Blastocisto=100%) en alpacas Huacaya donadoras naturales.

En las hembras a las que se realizó el lavado de cuerno uterino, se pudo colectar como máximo un solo embrión en estadio de blastocito expandido, a diferencia de lo que podemos observar en los tratamientos superovulatorios, en los cuales se pueden recuperar embriones en diferentes etapas como lo reportado por Cervantes (2008).

Según los resultados obtenidos por Jiménez (2009) en llamas, el porcentaje de embriones procedentes del cuerno uterino derecho fue 47.62% y para el cuerno uterino izquierdo fue 52.38%, siendo similar a nuestro trabajo realizado en alpacas, al haber recuperado el mayor porcentaje de embriones en el cuerno uterino izquierdo.

Cuadro 3.10: Clasificación de embriones según calidad IETS (Blastocisto=100%) en alpacas Huacaya donadoras naturales E.E.A. Canaán-INIA, Ayacucho-2011.

Calidad del embrión	Embriones recuperados	
	Nº	(%)
Excelente	4	50.00
Bueno	2	25.00
Regular	2	25.00
Total general	8	100.00

En el cuadro 3.10 se observa la clasificación de embriones recuperados en alpacas Huacaya donadoras naturales, lográndose el 50% (4/8) de los embriones de calidad Excelente, 25% (2/8) de calidad Bueno y 25% (2/8) de calidad Regular. Al análisis estadístico ($P \geq 0.05$), no existe diferencia estadística significativa entre la cantidad de embriones colectados y la calidad (Anexo 17).

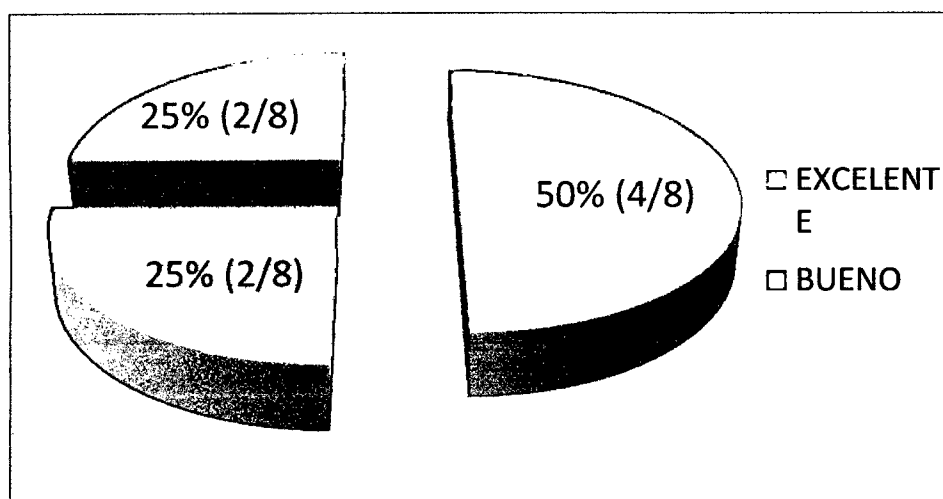


Gráfico 3.10: Clasificación de embriones según calidad IETS (Blastocisto = 100%) en alpacas Huacaya donadoras naturales.

Similares resultados fue logrado por Cervantes (2008) en un estudio sobre el momento óptimo de recuperación de embriones de alpacas por el método no quirúrgico; logrando a los 7 días post cópula, embriones de calidad: Excelente 49%; Buena 33.3%; Regular 19.1% y Mala 0%. Dichos resultados son superiores a los nuestros, lo cual podría deberse a la influencia de la condición corporal regular de las alpacas y al estrés producido por el manejo.

La calidad embrionaria es determinante para lograr el éxito de los procedimientos de transferencia de embriones para todas las especies. En ese sentido, al momento de evaluar los embriones colectados se tomó en cuenta el estadio de desarrollo, forma, color, tamaño y calidad porque podrían afectar la nidación y sobrevivencia de los mismos. Evangelista (2007), reporta dos tratamientos (A: control; B: superestimulación con eCG), cuyos resultados fueron: Grupo A: Excelente 60%, Bueno 20%, Regular 0% y Malo 20%; Grupo B: Excelente 40%, Bueno 30%, Regular 25% y Malo 5%; en ambos experimentos el 100% de embriones de calidad Excelente y Bueno eran transferibles a diferencia de lo expuesto por Correa y Col. (1997) quien obtuvo un 90.48% (19/21) de embriones clasificados como fértiles y un 9.52% (2/21) fue clasificado como muerto o degenerado. En nuestro estudio se obtuvieron porcentajes menores de embriones de calidad Excelente y Bueno, esto probablemente se debió a la condición corporal regular de los animales por los lavados sucesivos a los cuales fueron sometidos.

3.3. EVALUACIÓN DE RETORNO FOLICULAR

Cuadro 3.11: Retorno folicular tras colección de embriones a los 7 días post lavado en alpacas Huacaya donadoras naturales. E.E.A. Canaán-INIA, Ayacucho-2011.

Nº de Lavados sucesivos	Alpacas con retorno folicular		Alpacas sin retorno folicular	
	Nº	(%)	Nº	(%)
Primero	10	100	0	0
Segundo	5	50	5	50
Tercero	2	20	8	80

El cuadro 3.11 muestra el número y porcentaje de alpacas Huacaya donadoras naturales según número de lavados sucesivos, por el cual fueron 10/10 (100%) las alpacas que se sometieron a un solo lavado, 5/10 (50%) alpacas se sometieron a 2 lavados sucesivos y que presentaron 1 retorno folicular, y sólo 2/10 (20%) alpacas, a 3 lavados sucesivos presentando 2 retornos foliculares. La evaluación del retorno folicular luego del primer lavado a los 7 días, muestran que el 50% de los animales presentaron folículos preovulatorios ($\geq 7\text{mm}$ de diámetro), asimismo el 20% de las alpacas presentaron folículos preovulatorios luego del segundo lavado. Al análisis estadístico el porcentaje de retorno folicular es diferente en cada lavado ($P < 0.01$) (Anexo 18).

Esto indica que, a medida que las alpacas fueron sometidos a lavados sucesivos (1º, 2º y 3º), el número de alpacas se reduce paulatina y considerablemente, lo cual podría deberse al estrés del manejo generado

por la técnica utilizada y a la baja condición corporal permitiendo que algunos de los ejemplares no retornaran a desarrollar ondas foliculares post lavado a los 7 días, requiriéndose mayor tiempo para recuperarse.

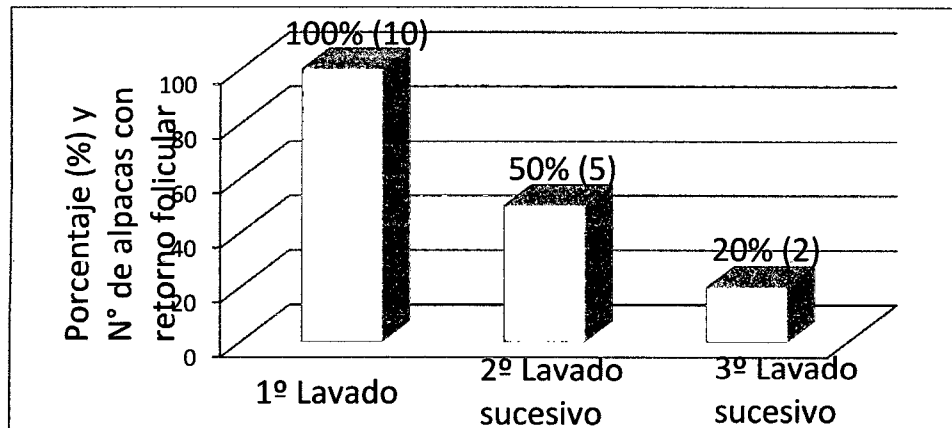


Gráfico 3.11: Retorno folicular tras colección de embriones en lavados uterinos sucesivos a los 7 días post lavado en alpacas Huacaya donadoras naturales.

Asimismo, se observó mediante ecografía, que el 100% de los animales a los 14 días post lavado sometidos a diferentes lavados presentaron nuevamente folículos preovulatorios (≥ 7 mm de diámetro).

Estos resultados demuestran que es factible realizar lavados sucesivos en alpacas para recuperar embriones aprovechando las ondas foliculares en forma natural; no se tiene mayor información sobre retorno folicular en donantes naturales; sin embargo Huanca y Col. (2006, 2007) reportan la recuperación de hembras donadoras superestimuladas, que al examen ecográfico a las 3 semanas posteriores al lavado, 85% de la hembras presentaron folículos preovulatorios, ello probablemente se debería a un mayor descanso de las hembras post lavado para la recuperación de embriones.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

1. Se logró producir y coleccionar embriones en alpacas Huacaya mediante un procedimiento de lavados intrauterinos sucesivos, en forma natural, sin la utilización de hormonas exógenas.

2. La actividad ovárica en alpacas Huacaya sometidas a lavados sucesivos intrauterinos no tuvo diferencias estadísticas significativas para: el diámetro de folículos y de cuerpos lúteos según ubicación de ovario y según número de lavados aplicados (1º, 2º y 3º), y también para la tasa de ovulación según ubicación de ovario. Por el contrario, la tasa de ovulación según número de lavados sucesivos sí demostró diferencia estadística significativa.

3. Los embriones recuperados de manera sucesiva en alpacas Huacaya obtenidos de forma natural fueron de calidad excelente en un 50%, bueno 25% y regular en 25% no existiendo diferencia estadística.
4. La tasa de recuperación de embriones en forma general fue de 61.54%, encontrándose el 100% de los embriones colectados en estado de blastocisto expandido. La tasa de recuperación de embriones según ubicación de cuerno uterino, es similar estadísticamente en el derecho e izquierdo; sin embargo, según número de lavados sucesivos (1º, 2º y 3º) sí mostraron diferencia estadística significativa.
5. El tiempo de retorno folicular a los 7 días luego del primer lavado, muestran que el 50% de alpacas presentaron folículos preovulatorios ($\geq 7\text{mm}$ de diámetro); posteriormente luego del segundo lavado, sólo el 20%, presentaron folículos preovulatorios.

4.2. RECOMENDACIONES

1. Realizar un trabajo de investigación similar con el objetivo de evaluar la influencia de la condición fisiológica de la alpaca hembra (lactante y no lactante) utilizando un mayor número de muestra, además se podría realizar un trabajo similar en la raza Suri.
2. Comprobar la viabilidad de embriones producidos de forma natural y realizar la transferencia de los mismos hacia receptoras de la misma especie, y además hacia receptoras de otra especie, como la llama.
3. Promover el fomento de biotecnologías reproductivas aplicadas en las especies domésticas (alpaca y llama) y silvestres (vicuña y guanaco) de camélidos sudamericanos, siendo la fuente de extensión las instituciones públicas y privadas encargadas del desarrollo pecuario y el progreso del sector alpaquero de la región.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Canaán (INIA)-Ayacucho, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, a 2735 m.s.n.m., con el objetivo de evaluar un procedimiento de producción y colección de embriones de alpacas Huacaya donadoras naturales, de manera sucesiva, obtenidos de forma natural, sin utilización de hormonas exógenas. Se utilizó 10 alpacas hembras adultas y para el empadre 4 alpacas machos adultos. Para el seguimiento de la dinámica ovárica se usó un ecógrafo veterinario transrectal. Los embriones se recuperaron a los 7 días post empadre, mediante el lavado intrauterino con catéter Foley y método no quirúrgico. La actividad ovárica no tuvo diferencias estadísticas para el diámetro de folículos y de cuerpos lúteos según ubicación de ovario y número de lavados sucesivos (1º, 2º y 3º); de igual forma para la tasa de ovulación según ubicación de ovario; sin embargo, la tasa de ovulación según número de lavados mostró diferencia estadística significativa. Los embriones recuperados fueron de calidad excelente en un 50%, bueno 25% y regular en 25%, no existiendo diferencia estadística. La tasa de recuperación de embriones en forma general fue de 61.54%, encontrándose el 100% de los embriones colectados en estado de blastocisto expandido. La tasa de recuperación de embriones según ubicación en el cuerno uterino, es similar; no obstante según número de lavados mostró diferencia estadística significativa. El tiempo de retorno folicular, 7 días, luego del 1º lavado mostró que el 50% de alpacas presentaron folículo preovulatorio; y sólo el 20%, luego del 2º lavado sucesivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aba, M; Kindahl, H; Forsberg, M; Quiroga, M; Auza, N. 2000. Levels of progesterone and changes in prostaglandin F^{2α} release during luteolysis and early pregnancy in llamas and the effect of treatment with flunixinmeglumine. *Animal Reproduction Science*. 59:87-97.
2. Adams, G; Sumar, J; Ginter, O. 1990. Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 90: 535-545.
3. Adams, G; Sumar, J; Ginther, O. 1991. Form and function of the corpus luteum in llamas. *Animal Reproduction Science* 24: 127 – 138.
4. Adams, G. 2001. Comparative aspects of follicular dynamics in camelids. En: *Revista de Investigación Veterinaria Perú*. Suplemento 1. XXIV Reunión Científica APPA. Lima. P. 142-146.
5. Adams, G; Ratto, M. 2001. Reproductive biotechnology in south american camelids. En *Resúmenes de la XXIV Reunión Científica Anual Peruana de Producción Animal*. Lima – Perú.
6. Aller, J; Cancino, A; Rebuffi, G; Alberio, R. 1999. Inducción de la ovulación en llamas. En: *II Congreso Mundial sobre camélidos*. Resumen Cusco. P. 91.
7. 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.

8. Bazer, F; Vallet, J; Roberts, R; Sharp, D; Thatcher, W. 1986. Role of conceptus secretory products in establishment of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*. 76(2):841-850.
9. Bourke, D; Adam, C. 1992. Ovulation, superovulation and embryo recovery in llamas. 12th International Congress on Animal Reproduction.
10. Bourke, D; Kyle, C; Mcevoy, T; Young, P; Adam, C. 1995. Superovulatory responses to eCG in llamas (*Lama glama*). *Theriogenology* 44: 255-268.
11. Bravo, P; Sumar, J. 1989. Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. *Animal Reproduction Science* 21: 271-281.
12. Bravo, P; Fowler, M; Stabenfeldt, G; Lasley B. 1990. Ovarian follicular dynamics in the llama. *Biology Reproduction*. 43:579-585.
13. Bravo, P; Moscoso, J; Ordóñez, C; Alarcón, V. 1996. Transport of spermatozoa and ova in female alpaca. *Animal Reproduction Science*. 43: 173-179.
14. Brown, B. 2000. A review on reproduction in south american camelids. *Animal Reproduction Science*. 58: 169-195.
15. Bustinza, V; Medina, G. 1986. Crecimiento de alpacas. In: Precongreso V Convención Internacional de Sistemas Agropecuarios Andinos, Puno, Perú.

16. Cervantes, M. 2008. Momento óptimo post cópula para la recuperación de embriones del útero de alpaca mediante método quirúrgico. Tesis de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 43 p.
17. Correa, J; Ratto, M. 1994. Oestrous activity and ovarian response in llamas and alpacas treated with progesterone and gonadotropins. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 26(1): 59-64.
18. Correa, J; Ratto, M; Gatica, R. 1997. Superovulation in llamas (*Lama glama*) with pFSH and equine chorionic gonadotropin used individually or in combination. *Animal Reproduction Science*. 46: 289-296.
19. 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 p.
20. 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.
21. England, B; Foote, W; Matthews, D; Cardozo, A; Riera, S. 1969. Ovulation and corpus luteum function in the llama (*Lama glama*). *Journal Endocrinology*. 45: 505-513.
22. 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. Asociación Peruana de Producción Animal - Asociación Latinoamericana de Producción Animal - Cusco, Perú.

23. Fernandez Baca, S; Hansel, W; Novoa, C. 1970. Embryonic modalito in the Alpaca. *Biology of Reproduction* 3(2): 243 – 251.
24. Fernández Baca, S. 1971. La alpaca. Reproducción y crianza. Facultad de Med. Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima P. 43.
25. Fernández Baca, S; Sumar, J; Novoa, C. 1972. Comportamiento de la alpaca macho frente a la renovación de las hembras. *Revista de Investigaciones Pecuarias (IVITA)*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 1:115-128.
26. Fernández Baca, S; Sumar, J; Novoa, C; Leyva, V.1973. Relación entre la ubicación del cuerpo lúteo y la localización del embrión en la alpaca. *Revista de Investigaciones Pecuarias - IVITA*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2(2):131-135.
27. Fernández Baca, S; Hansel, W; Saatman, R; Sumar, J; Novoa, C. 1979. Differential luteolytic effects of right and left uterine horns in the alpaca. *Biology of Reproduction*. 20:586-595.
28. Fernández Baca, S. 1993. Manipulation of reproductive functions in male and female new world camelids. *Animal Reproduction Science*. 33:307-323.

29. Goriach, A. 1999. Transferencia de embriones en el ganado vacuno. Editorial Acribia. Zaragoza – España.
30. Grier, H. 1992. Chordatetestis: The extracelular matriz hipótesis. *Journal of Experimental Zoology*. 261: 151 – 160.
31. Hafez, E. 2000. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ma ed. Editorial Interamericana Mc Graw-Hill. México. P. 525.
32. Huanca, W. 2001. Efecto hormonal y empadre sobre intervalo a la ovulación en llamas. *Revista de Investigaciones Veterinarias*. Perú. Suplemento 1:462-463.
33. Huanca, W. 2004. Aplicación de biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos. En Resúmenes de la XXIV Reunión científica anual peruana de producción animal. Piura – Perú.
34. Huanca, W; Huanca, T; Ratto, M; Cordero, A; Cardenas, O; Apaza, N. 2004. CIP Qimsachata. Pionera en biotecnología reproductiva, Transferencia de embriones en alpacas y llamas. *Revista de la Estación Experimental Illpa - Puno – Perú*.
35. Huanca, W; Gonzalez, 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.
36. Huanca, W; Cordero, A; Huanca, T; Adams, G. 2007. Biotecnologías reproductivas en Camélidos Sudamericanos domésticos: Avances y

- perspectivas. En Resúmenes de la XX Reunión ALPA, XXX Reunión científica anual peruana de producción animal. Cusco-Perú.
37. Illera, M. 1994. Sistema reproductivo del macho y su control endocrino. En: Reproducción de los animales domésticos Cap. 4. Barcelona – España: Aedos Ediciones. P. 97 – 129.
38. Jiménez, J. 2009. Producción y colección de embriones producidos de forma natural y su influencia en el retorno del celo en llamas (*Lama glama*) en el “Centro de Investigación y Producción Quimsachata”, distrito Santa Lucia, provincia de Lampa, región Puno. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. Universidad Católica Santa María. 97 p.
39. Johnson, J; Canning, J; Kaneko, T; Pru, J; Tilly, J. 2004. Germline stem cells and follicular renewals in the postnatal mammalian ovary. Nature 428: 145 - 150.
40. Leyva, V; Sumar, J. 1981. Evaluación del peso corporal al empadre sobre la capacidad reproductiva de hembras alpaca de un año de edad. En: Precongreso IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos, Punta Arenas, Chile.
41. Leyva, V; García, W. 1999. Efecto de la progesterona exógena sobre la función del cuerpo lúteo de alpacas. En: II Congreso mundial sobre camélidos. Resumen. P. 87. Cusco, Perú.

42. McLaren, A. 1974. Fertilization, cleavage and implantation. In: Hafez ESE, editorial. *Reproduction in Farm Animals*. Philadelphia: Lea &Febiger.
43. Merk, H; Boer, M; Rath, D; Schoo, H. 1988. The presence of an additional fetal membrane and its function in the newborn guanaco (*Lama guanicoe*). *Theriogenology*; 30:437-439.
44. Murdoch, W. 1995. Programmed cell death in preovulatory ovine follicles. *Biology of Reproduction*. 53 (1): 8-12.
45. Novoa, C; Sumar, J. 1968. Colección de huevos in vivo y ensayo de transferencia en alpacas. *Boletín extraordinario del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura - Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. Lima, Perú, 3:31 - 34.
46. Novoa, C. 1989. Reproducción. En: Simposio de producción de alpacas y llamas. XII Reunión científica anual. Asociación Peruana de Producción Animal. Perú. P. 67-72.
47. Novoa, C. 1991. Fisiología de la reproducción de la hembra. En: *Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos*. Capítulo III Editorial Fernández Baca, Santiago. P. 93-103.
48. Novoa, C; Franco, E. 1999. Dosis de gonadotropinas (eCG y hCG), superovulación y obtención de embriones en alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias*. Perú. 10(1): 48-53.

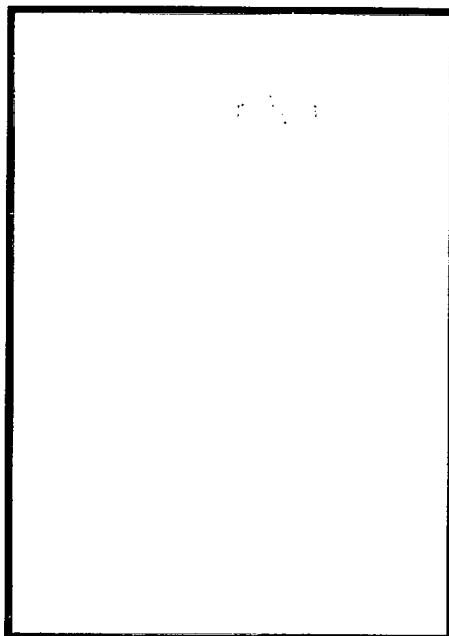
49. Panez, S. 2007. Efecto del sitio de deposición del plasma seminal sobre la tasa de ovulación y formación del cuerpo lúteo en alpacas. Tesis de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 43 p.
50. San Martín, M; Copaira, M; Zúñiga, J; Rodríguez, R; Bustinza, G; Acosta, L. 1968. Aspects of reproduction in the alpaca. *Journal of Reproduction and Fertility*. 16:395-399.
51. Sato, A; Montoya, L. 1990. Aparato reproductor de la alpaca (*Lama pacos*). Anatomía Macroscópica. Revista de Camélidos Sudamericanos 7. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
52. Schillo, K. 1992. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *Journal Animal Science*. 70:1271.
53. Smitz, J; Cortvrindt, T. 2002. The earliest stages of folliculogenesis *in Vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 123: 185 – 202.
54. Steven, D; Burton, G; Sumar, J; Nathanielsz, P. 1980. Ultrastructural observations on the placenta of the alpaca (*Lama pacos*). *Placenta*; 1:21-32.
55. Sumar, J; Franco, E. 1974. Ensayo de Transferencia de Embriones en Camélidos Sudamericanos. En: Informe Final (IVITA) Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
56. Sumar, J; Leyva, V. 1979. . Relación entre la ubicación del cuerpo lúteo y la localización del embrión en la llama. En: Precongreso III Convenio Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Viedma, Argentina.

57. Sumar, J. 1985. Algunos aspectos obstétricos de la alpaca. Boletín Técnico N° 2. IVITA, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Convenio CIID-Canadá.
58. Sumar, J; Fredricksson, G; Alarcón, V; Kindahl, H; Edqvist, L. 1988. Levels of 15-keto 13, 14 dihydro-PGF₂, Progesterone and Oestradiol-7b after induced ovulations in llamas and alpacas. Acta Veterinaria Scandinavica 29(3-4): 339 – 346.
59. Sumar, J. 1991. Fisiología de la Reproducción del Macho y Manejo Reproductivo. En: Avances y Perspectivas del Conocimiento de los Camélidos Sudamericanos. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, Santiago, Chile.
60. Sumar, J. 1997. Avances y perspectivas en reproducción de camélidos. En: Memorias del I Simposium internacional, Avances en reproducción de rumiantes. Lima. P. 30-44.
61. Sumar, J. 2000. Llamas and alpacas. In: Reproduction in faro animals, Edited by Hafez, ESE. 7ma Edición. USA. P. 218-228.
62. Taylor, S; Taylor, P; James, A; Godke, R. 2000. Successful commercial embryo transfer in the Llama (*Lama glama*). Theriogenology. 53,1-344.
63. Vasquez, 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. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 34 p.

64. Vivanco, W; Cárdenas, H; Bindon, B. 1985. Relación entre la duración de la cópula y momento de ovulación en alpacas. En: Resumen XII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Perú. Lima. P. 19.
65. Wassarman, P. 1990. Profile of a mammalian sperm receptor. *Development*. 108:1-17.
66. Wilson Wiepz, D; Chapman, R. 1985. Non surgical embryo transfer and live birth in a llama. *Theriogenology*. 24 (2): 251 – 257.

A N E X O S

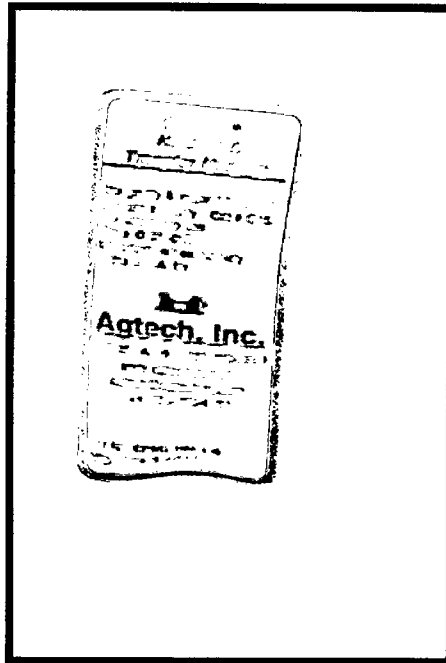
IMÁGENES



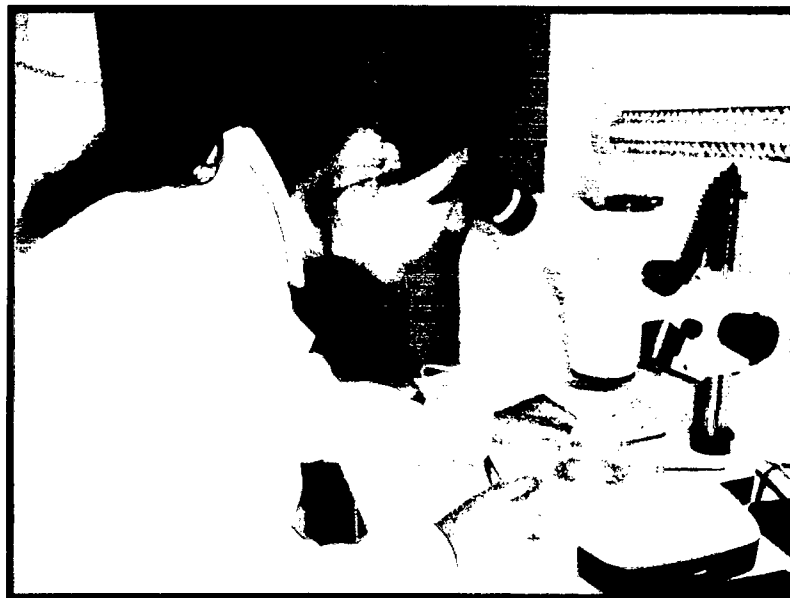
Anexo 01: Medio de lavado BioLife™ Advantage, bolsa de 1 litro. Agtech.



Anexo 02: Medio de lavado recuperado desde el cuerno uterino y tamizado a través de un filtro EMCOM.



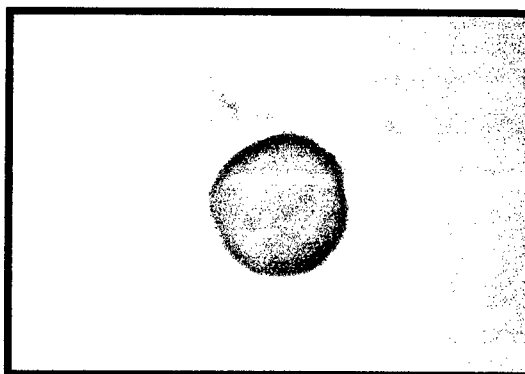
Anexo 03: Medio de preservación y transferencia de embriones BioLife™ bolsa de 60 ml. Agtech.



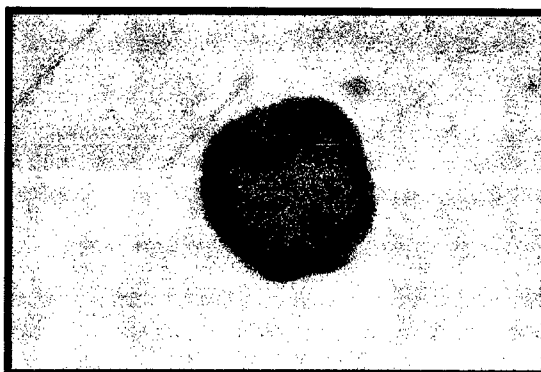
Anexo 04: Evaluaron y clasificación de embriones mediante el uso del estereoscopio.



Anexo 05: Embrión de calidad excelente de alpaca Huacaya donadora natural.


















Anexo 06: Embrión de calidad bueno de alpaca Huacaya donadora natural.



Anexo 07: Embrión de calidad regular de alpaca Huacaya donadora natural.

Anexo 08: Modelo de ficha individual de alpacas hembra Huacaya donadoras naturales.

		DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION AGRARIA SUB DIRECCION NACIONAL DE INVESTIGACION EN CRIANZAS PROYECTO NACIONAL DE INVESTIGACION EN CAMELIDOS GOBIERNO REGIONAL BIOTECNOLOGIA REPRODUCTIVA EN ALPACAS	
		CONVENIO: SUB PROYECTO:	
ARETE:		RAZA:	COLOR:
Día	Ovario derecho	Ovario izquierdo	Observación
			
			
			
			
			
			
			

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Anexo 09: Análisis de Variancia para diámetro folicular (mm) al Día 0, según número de lavados sucesivos.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-valor	Pr > F
Modelo	2	6.22941176	3.11470588	0.96	0.4058
PROCEDIMIENTO	2	6.22941176	3.11470588	0.96	0.4058
Error	14	45.30000000	3.23571429		
Total corregido	16	51.52941176			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	TF Media
0.120890	21.68777	1.798809	8.294118

PRUEBA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES DE DUNCAN PARA TAMAÑO FOLICULAR AL DÍA 0, SEGÚN NÚMERO DE LAVADOS SUCESIVOS

Duncan

Agrupamiento	Media	N	PROCEDIMIENTO (NÚMERO DE LAVADOS SUCESIVOS)
A	9.200	5	P2
A	8.000	10	P1
A	7.500	2	P3

Anexo 10: Prueba de T Student para diámetro folicular (mm), según ubicación de ovario al día 0.

LAD00V	N	Media	Dev std	Err std	Mínimo	Máximo
D	11	7.8182	1.0787	0.3252	7.0000	10.0000
I	6	9.1667	2.5626	1.0462	7.0000	14.0000
Diff (1-2)		-1.3485	1.7218	0.8739		

LAD00V	Método	Media	95% CL Media	Dev std	95% CL Dev std
D		7.8182	7.0935 8.5429	1.0787	0.7537 1.8931
I		9.1667	6.4774 11.8559	2.5626	1.5996 6.2849
Diff (1-2)	Combinada	-1.3485	-3.2111 0.5141	1.7218	1.2719 2.6648
Diff (1-2)	Satterthwaite	-1.3485	-4.0308 1.3338		

Método	Varianzas	DF	Valor t	Pr > t
Combinada	Igual	15	-1.54	0.1436
Satterthwaite	Unequal	5.9853	-1.23	0.2645

Igualdad de varianzas

Método	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
Folded F	5	10	5.64	0.0199

Anexo 11: Análisis de variancia para diámetro de cuerpos lúteos (mm) según número de lavados sucesivos.

Fuente	DF	suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	2.57692308	1.28846154	0.57	0.5815
NÚMERO DE LAVADOS	2	2.57692308	1.28846154	0.57	0.5815
Error	10	22.50000000	2.25000000		
Total corregido	12	25.07692308			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	TCL Media
0.102761	12.91391	1.500000	11.61538

PRUEBA DE COMPRACIONES MÚLTIPLES DE DUNCAN PARA TAMAÑO DE CUERPOS LÚTEOS SEGÚN NÚMERO DE LAVADOS SUCEIVOS

Duncan

Agrupamiento	Media	N	NÚMERO DE LAVADO
A	12.000	7	P1
A	11.500	2	P3
A	11.000	4	P2

Anexo 12: Prueba de T Student para tamaño de cuerpos lúteos según ubicación de ovario.

LADOOV	N	Media	Dev std	Err std	Mínimo	Máximo
D	9	11.6667	1.6583	0.5528	9.0000	14.0000
I	4	11.5000	1.0000	0.5000	11.0000	13.0000
Diff (1-2)		0.1667	1.5076	0.9059		

LADOOV	Método	Media	95% CL Media		Dev std	95% CL Dev std	
D		11.6667	10.3920	12.9414	1.6583	1.1201	3.1769
I		11.5000	9.9088	13.0912	1.0000	0.5665	3.7285
Diff (1-2)	Combinada	0.1667	-1.8273	2.1606	1.5076	1.0679	2.5596
Diff (1-2)	Satterthwaite	0.1667	-1.5061	1.8395			

Método	Varianzas	DF	Valor t	Pr > t
Combinada	Igual	11	0.18	0.8574
Satterthwaite	Unequal	9.4955	0.22	0.8278

Igualdad de varianzas

Método	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
Folded F	8	3	2.75	0.4375

Anexo 13: Prueba De Chi Cuadrado para Tasa de ovulación general según número de lavados sucesivos.

Nº de Lavados sucesivos	No ovuló		Si ovuló			Total general		
	n	%	Valor Angular	n	%	Valor Angular	n	%
Primero	3	30	33.21	7	70.00	56.79	10	100
Segundo	1	20	26.57	4	80.00	63.43	5	100
Tercero	0	0	0.00		100.00	90.00	2	100
Total general	4	23.53		13	76.47		17	100

Sistema SAS

```

Obs      N° DE LAVADO OVULACION      COUNT
1         1           NO          33.21
2         1           SI           56.79
3         2           NO          26.57
4         2           SI           63.43
5         3           NO           0.00
6         3           SI           90.00
    
```

Procedimiento FREQ

Tabla de PROCEDIMIENTO por OVULACION

PROTOCOLO OVULACION

Frecuencia,

Porcentaje,

Pct fila ,

Pct col ,NO ,SI , Total

~~~~~

1 , 33.21 , 56.79 , 90

|                                         |           |          |        |
|-----------------------------------------|-----------|----------|--------|
|                                         | , 12.30 , | 21.03 ,  | 33.33  |
|                                         | , 36.90 , | 63.10 ,  |        |
|                                         | , 55.55 , | 27.01 ,  |        |
| ffffffffffff^ffffffffffff^ffffffffffff^ |           |          |        |
| 2                                       | , 26.57 , | 63.43 ,  | 90     |
|                                         | , 9.84 ,  | 23.49 ,  | 33.33  |
|                                         | , 29.52 , | 70.48 ,  |        |
|                                         | , 44.45 , | 30.17 ,  |        |
| ffffffffffff^ffffffffffff^ffffffffffff^ |           |          |        |
| 3                                       | , 0 ,     | 90 ,     | 90     |
|                                         | , 0.00 ,  | 33.33 ,  | 33.33  |
|                                         | , 0.00 ,  | 100.00 , |        |
|                                         | , 0.00 ,  | 42.81 ,  |        |
| ffffffffffff^ffffffffffff^ffffffffffff^ |           |          |        |
| Total                                   | 59.78     | 210.22   | 270    |
|                                         | 22.14     | 77.86    | 100.00 |

Estadísticos para la tabla de NÚMERO DE LAVDOS por OVULACION

| Estadístico                                                                      | DF | Valor   | Prob   |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|---------|--------|
| ffffffffffffffffffffffffffffffffffffffffffffffffffffffffffffffffffffffffffffffff |    |         |        |
| Chi-cuadrado                                                                     | 2  | 39.8107 | <.0001 |
| Chi-cuadrado de ratio de verosimilitud                                           | 2  | 57.7562 | <.0001 |
| Chi-cuadrado Mantel-Haenszel                                                     | 1  | 35.4121 | <.0001 |
| Coficiente Phi                                                                   |    | 0.3840  |        |
| Coficiente de contingencia                                                       |    | 0.3585  |        |
| v de Cramer                                                                      |    | 0.3840  |        |

Tamaño de la muestra = 270

**Anexo 14: Prueba De Chi Cuadrado para Tasa de ovulación según ovario.**

| Lado de ovario | No ovuló |       | Valor Angular | Si ovuló |       | Valor Angular | Total general |     |
|----------------|----------|-------|---------------|----------|-------|---------------|---------------|-----|
|                | n        | %     |               | n        | %     |               | n             | %   |
| Derecho        | 2        | 18.18 | 25.24         | 9        | 81.82 | 64.76         | 11            | 100 |
| Izquierdo      | 2        | 33.33 | 35.26         | 4        | 66.67 | 54.74         | 6             | 100 |
| Total general  | 4        | 23.53 |               | 13       | 76.47 |               | 17            | 100 |

Sistema SAS

| Obs | LADO    | OVULACION | COUNT |
|-----|---------|-----------|-------|
| 1   | DERECHO | NO        | 25.24 |
| 2   | DERECHO | SI        | 64.76 |
| 3   | IZQUIER | NO        | 35.26 |
| 4   | IZQUIER | SI        | 54.74 |

Sistema SAS

Procedimiento FREQ

Tabla de LADO por OVULACION

```

LADO      OVULACION
Frecuencia,
Porcentaje,
Pct fila ,
Pct col  ,NO      ,SI      , Total

```

```

~~~~~`~~~~~`~~~~~`

```

|         |           |         |        |
|---------|-----------|---------|--------|
| DERECHO | , 25.24 , | 64.76 , | 90     |
|         | , 14.02 , | 35.98 , | 50.00  |
|         | , 28.04 , | 71.96 , |        |
|         | , 41.72 , | 54.19 , |        |
| ~~~~~   |           |         |        |
| IZQUIER | , 35.26 , | 54.74 , | 90     |
|         | , 19.59 , | 30.41 , | 50.00  |
|         | , 39.18 , | 60.82 , |        |
|         | , 58.28 , | 45.81 , |        |
| ~~~~~   |           |         |        |
| Total   | 60.5      | 119.5   | 180    |
|         | 33.61     | 66.39   | 100.00 |

Estadísticos para la tabla de LADO por OVULACION

| Estadístico                            | DF | Valor   | Prob   |
|----------------------------------------|----|---------|--------|
| ~~~~~                                  |    |         |        |
| Chi-cuadrado                           | 1  | 2.4997  | 0.1139 |
| Chi-cuadrado de ratio de verosimilitud | 1  | 2.5083  | 0.1132 |
| Chi-cuadrado adj. de continuidad       | 1  | 2.0256  | 0.1547 |
| Chi-cuadrado Mantel-Haenszel           | 1  | 2.4858  | 0.1149 |
| Coefficiente Phi                       |    | -0.1178 |        |
| Coefficiente de contingencia           |    | 0.1170  |        |
| v de Cramer                            |    | -0.1178 |        |

Tamaño de la muestra = 180

**Anexo 15:** Prueba Chi Cuadrado para Tasa de recuperación de embriones en función del número de cuerpos lúteos según número de lavados sucesivos.

| Nº de Lavados sucesivos | Número de cuerpos lúteos | Embriones recuperados | Tasa recuperación embriones (%) | Valores Angulares |
|-------------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------------------|-------------------|
| Primero                 | 7                        | 3                     | 42,86                           | 40.90             |
| Segundo                 | 4                        | 3                     | 75                              | 60.00             |
| Tercero                 | 2                        | 2                     | 100.00                          | 90.00             |
| <b>Total general</b>    | <b>13</b>                | <b>8</b>              | <b>61.54</b>                    |                   |

Frecuencias

| Nº de Lavados sucesivos | v1        |             |            |          |
|-------------------------|-----------|-------------|------------|----------|
|                         | Categoría | N observado | N esperado | Residual |
| Primero                 | 1.00      | 41          | 63.7       | -22.7    |
| Segundo                 | 2.00      | 60          | 63.7       | -3.7     |
| Tercero                 | 3.00      | 90          | 63.7       | 26.3     |
| Total                   |           | 191         |            |          |

Estadístico de contraste

|                 | v1     |
|-----------------|--------|
| Chi-cuadrado(a) | 19.173 |
| gl              | 2      |
| Sig. asintót.   | .000   |

A 0 casillas (.0%) tienen frecuencias esperadas menores que 5. La frecuencia de casilla esperada mínima es 63.7.

**Anexo 16: Prueba Chi Cuadrado para Tasa de recuperación de embriones en función del cuerno uterino y número de cuerpos lúteos.**

| Cuerno uterino | Número de cuerpos lúteos | Número de embriones recuperados | Tasa de recuperación % | Valores Angulares |
|----------------|--------------------------|---------------------------------|------------------------|-------------------|
| Derecho        | 9                        | 5                               | 55.56                  | 48.19             |
| Izquierdo      | 4                        | 3                               | 75.00                  | 60.00             |
| Total general  | 13                       | 8                               | 61.54                  |                   |

Frecuencias

|           | v1        |             |            |          |
|-----------|-----------|-------------|------------|----------|
|           | Categoría | N observado | N esperado | Residual |
| DERECHO   | 1.00      | 48          | 54.0       | -6.0     |
| IZQUIERDO | 2.00      | 60          | 54.0       | 6.0      |
| Total     |           | 108         |            |          |

Estadístico de contraste

|                 | v1    |
|-----------------|-------|
| Chi-cuadrado(a) | 1.333 |
| gl              | 1     |
| Sig. asintót.   | .248  |

A 0 casillas (.0%) tienen frecuencias esperadas menores que 5. La frecuencia de casilla esperada mínima es 54.0.



**Anexo 17: Prueba de Chi Cuadrado para clasificación de embriones según calidad.**

| Calidad del embrión | Nº de embriones | Porcentaje (%) | Valores angulares |
|---------------------|-----------------|----------------|-------------------|
| Excelente           | 4               | 50.00          | 45.00             |
| Bueno               | 2               | 25.00          | 30.00             |
| Regular             | 2               | 25.00          | 30.00             |
| Total general       | 8               | 100.00         |                   |

Frecuencias

|           | v1        |             |            |          |
|-----------|-----------|-------------|------------|----------|
|           | Categoría | N observado | N esperado | Residual |
| Excelente | 1.00      | 45          | 35.0       | 10.0     |
| Bueno     | 2.00      | 30          | 35.0       | -5.0     |
| regular   | 3.00      | 30          | 35.0       | -5.0     |
| Total     |           | 105         |            |          |

Estadístico de contraste

|                 | v1    |
|-----------------|-------|
| Chi-cuadrado(a) | 4.286 |
| gl              | 2     |
| Sig. asintót.   | .117  |

A 0 casillas (.0%) tienen frecuencias esperadas menores que 5. La frecuencia de casilla esperada mínima es 35.0.