

**UNIVERSIDAD NACIONAL SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE MEDICINA
VETERINARIA**



**“EFICIENCIA DE LA RESPUESTA OVÁRICA Y
PRODUCCIÓN EMBRIONARIA EN ALPACAS (*Vicugna
pacos*) SUPEROVULADAS EN FORMA CONSECUTIVA –
PUNO, 4300 M.S.N.M.”**

Tesis para optar el título profesional de:

MÉDICO VETERINARIA

Presentada por:

MARLENE MIGUEL GONZALES

AYACUCHO – PERÚ

2014

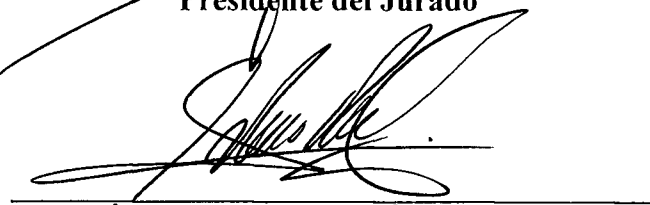
**“EFICIENCIA DE LA RESPUESTA OVÁRICA Y PRODUCCIÓN
EMBRIONARIA EN ALPACAS (*Vicugna pacos*) SUPEROVULADAS
EN FORMA CONSECUTIVA – PUNO, 4,300 m.s.n.m.”**

Recomendado : 01 de setiembre de 2014

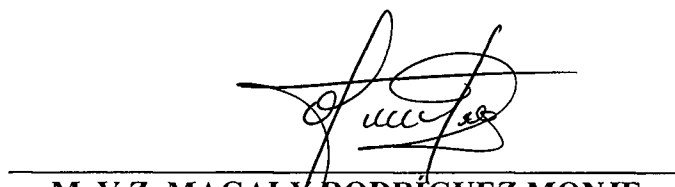
Aprobado : 19 de setiembre de 2013



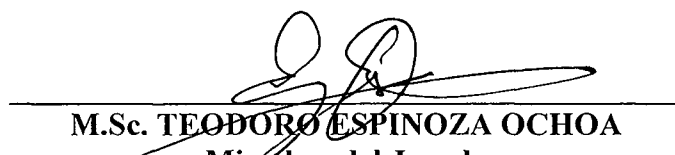
M.V. FLORENCIO CISNEROS NINA
Presidente del Jurado



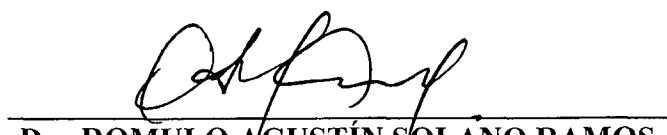
Dr. LUÍS ARTURO RODRÍGUEZ ZAMORA
Miembro del Jurado



M. V.Z. MAGALY RODRÍGUEZ MONJE
Miembro del Jurado



M.Sc. TEODORO ESPINOZA OCHOA
Miembro del Jurado



Dr. ROMULO AGUSTÍN SOLANO RAMOS
Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias

DEDICATORIA

Dedico este modesto trabajo

A mis padres Juan Marcelino y Estela, que desde siempre me inculcaron la importancia del conocimiento y con amor supieron darme una formación humana digna.

A cada integrante de mi familia, por el amor y apoyo desinteresado, por ser fuentes de inspiración y esperanza.

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos:

- A la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Facultad de Ciencias Agrarias y con ella a la Escuela de Formación Profesional de Medicina Veterinaria; por brindarme una formación académica de Excelencia en el seno de una gran familia de docentes, quienes desde que ingresé a las aulas y durante mis años de permanencia me brindaron sus conocimientos y experiencias.
- Al Fundo Mallkini, perteneciente al grupo Michell y CIA S.A., donde se realizó el presente trabajo; por todas las facilidades materiales y humanas que me proporcionaron, y particularmente al Ing. Moisés Asparrin Tapia, administrador del fundo por el apoyo, confianza y calidez brindado durante mi estancia.
- Con especial énfasis al PhD. Henry William Vivanco Mackie, por su contribución científica y guía en este proceso de aprendizaje; por

sobre todo, por su invaluable apoyo y asesoramiento en la ejecución del presente trabajo de investigación; y con él a todo el equipo Vivanco International por el apoyo técnico durante los trabajos realizados.

- Al PhD. Curtis R. Youngs. Profesor de la Universidad de IOWA del departamento de ciencia animal, por la amistad y las enseñanzas brindadas durante la ejecución del presente trabajo.
- Al Dr. Luis Arturo Rodríguez Zamora, quien gentilmente aceptó ser mi asesor, por su orientación, paciencia y comprensión, especialmente por el apoyo brindado para lograr la meta dentro del tiempo previsto.
- A los miembros de mi jurado, por la disposición y apoyo en todo momento.
- Al Fondo del Gobierno Peruano para la Investigación y el Desarrollo (FINCYT), por el apoyo económico para la adquisición de los insumos necesarios para la ejecución del presente trabajo de investigación.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Fundo Mallkini del Grupo Michell y CIA, ubicado en el Distrito de Muñani, Provincia de Azángaro del Departamento de Puno; a 4,300 msnm.; donde, se seleccionó 17 alpacas hembras teniendo en cuenta el valor genético y estado reproductivo; estas alpacas fueron sometidas a un tratamiento superovulatorio en dos ocasiones con un intervalo de 40 días entre colecciones.

Mediante el ecosonógrafo se determinó la presencia de folículos ≥ 8 mm. las mismas que fueron inducidas a ovular mediante el empadre con machos vasectomizados y la aplicación post cópula de una dosis im. de 0.0084 mg. de Acetato de Buserelina (día 0); al día 2, se aplicó una dosis de 1000 UI de eCG y 5 días después (día 7) una dosis de 0.25 mg. de Cloprostenol para inducir la luteólisis, siendo empadradas 24 y 36 horas después, con machos enteros, asimismo se aplicó 0.0084 mg. de Acetato de Buserelina en la primera monta. La colecta se realizó el día 6.5 posterior

al primer empadre por vía transcervical previa evaluación ovárica a través del ecosonógrafo. Los embriones obtenidos fueron evaluados y clasificados según el sistema de la IETS (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones).

La respuesta superovulatoria se expresó en valores promedios de 6.88 ± 2.15 y 6.94 ± 3.17 cuerpos lúteos para la primera y segunda ronda, respectivamente; asimismo la media de las estructuras recuperadas (blastocitos, mórulas y OFUs) y la producción de embriones transferibles por colección fue de 4.41 ± 5.61 y 4.35 ± 5.13 en la primera ronda y 3.59 ± 3.34 y 3.35 ± 3.22 para la segunda ronda, respectivamente; no existiendo diferencia significativa ($P > 0.05$) entre las dos rondas. El coeficiente de correlación para el número de cuerpos lúteos entre la primera y segunda superovulación fue mediano ($r = 0.5$) y para el número de embriones transferibles entre colecciones consecutivas fue alto ($r = 0.83$), lo que indica que hay una tendencia de las alpacas a repetir su respuesta superovulatoria entre colecciones sucesivas y una comprobada eficiencia en la respuesta ovárica y producción de embriones transferibles.

Palabras claves: Eficiencia, Superovulación, Embriones, Alpacas.

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1.1 Caracterización de la alpaca huacaya	3
1.2 Anatomía reproductiva de la hembra	4
1.3 Comportamiento sexual de la alpaca hembra	6
1.3.1 Pubertad	7
1.3.2 Estación reproductiva	7
1.3.3 Comportamiento sexual en el estro	9
1.3.4 Comportamiento del empadre	11
1.3.5 Comportamiento sexual durante la fase luteal	13
1.4 Fisiología reproductiva de la hembra	14
1.4.1 Foliculogénesis	14
1.4.2 Dinámica folicular	15
1.4.3 Ovulación	19
1.4.4 Actividad luteal	24
1.4.5 Luteólisis	26
1.5 Tecnologías reproductivas asistidas	29
1.5.1 Sincronización de la dinámica del crecimiento folicular.	29
1.5.2 Inducción a la ovulación	30
1.5.3 Superestimulación ovárica	31
1.5.4 Hormonas utilizadas para la superestimulación ovárica	32
1.5.5 Recuperación y transferencia de embriones	35
1.5.6 Influencia del tratamiento superovulatorio en la posterior fertilidad de la hembra donante.	36
MATERIALES Y MÉTODOS	37

2.1.	Ubicación.....	37
2.2.	Características geográficas.	37
2.3.	Materiales.....	38
2.4.	Metodología.....	39
2.4.1.	Animales.....	39
2.4.2.	Tratamiento superovulatorio.....	41
2.4.3.	Colección de datos.	42
2.4.4.	Parámetros de evaluación.	42
2.4.5.	Análisis estadístico.	47
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		48
3.1.	De la respuesta superovulatoria	48
3.2.	De la respuesta embrionaria.....	52
3.3.	De la clasificación de embriones	55
3.4.	De la respuesta al tratamiento superovulatorio	59
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		63
4.1.	Conclusiones	63
4.2.	Recomendaciones.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....		65
ANEXOS.....		76

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1: Materiales y equipos.	38
Cuadro 2: Protocolo de tratamiento superovulatorio.	42
Cuadro 3: Clasificación de embriones por calidad según la IETS	46
Cuadro 4: Respuesta superovulatoria al tratamiento sucesivo.	50
Cuadro 5: Respuesta embrionaria al tratamiento superovulatorio sucesivo	52
Cuadro 6: Clasificación de embriones según el sistema de la IETS	55
Cuadro 7: Calidad de embriones expresado en porcentaje.	58
Cuadro 8: Comparación de datos mediante la Prueba de F.	60

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1: Porcentaje de cuerpos lúteos y folículos – Primera ronda	51
Gráfico 2: Porcentaje de cuerpos lúteos y folículos – Segunda ronda	51
Gráfico 3: Distribución de los embriones obtenidos según calidad - Primera ronda	58
Gráfico 4: Distribución de los embriones obtenidos según calidad - Segunda ronda	59
Gráfico 5: Coeficiente de correlación para el número de cuerpos lúteos	61
Gráfico 6: Coeficiente de correlación para el número de embriones transferibles	62

LISTA DE IMÁGENES.

	Pág.
Imagen 1: Selección de donadoras a través de palpación rectal.	39
Imagen 2: Evaluación de actividad ovárica con el ecosonógrafo veterinario	40
Imagen 3: Evaluación de respuesta superovulatoria previo al lavado embrionario.	43
Imagen 4: Lavado embrionario vía transcervical.	43
Imagen 5: Filtrado del medio de lavado recuperado	44
Imagen 6: Búsqueda de embriones mediante el estereomicroscopio.	45
Imagen 7: Vista ecosonográfica de Folículos.	49
Imagen 8: Vista ecosonográfica de Cuerpos lúteos.	49
Imagen 9: Embriones producidos por la donadora 1-4-745	53
Imagen 10: Embriones producidos por la donadora 1-9-026	53
Imagen 11: A - Blastocisto Expandido. Calidad: Excelente.	56
Imagen 12: B - Blastocisto Expandido. Calidad: Buena.	56
Imagen 13: B - Blastocisto Elongado. Calidad: Buena.	56
Imagen 14: C - Blastocisto Expandido. Calidad: Regular.	57
Imagen 15: Mórula - UFO. Calidad: Degenerado.	57

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1: Evaluación ecosonográfica de ovarios y embriones obtenidos - Primera ronda.	76
ANEXO 2: Evaluación ecosonográfica de ovarios y embriones obtenidos - Segunda ronda.	77
ANEXO 3: Respuesta superovulatoria y producción de embriones acumulado	78
ANEXO 4: Tabla de coeficiente de correlación de PEARSON	79

INTRODUCCIÓN

El Perú cuenta con la mayor población mundial de alpacas, siendo éstas de gran importancia e impacto en el desarrollo socio económico de la zona alto andina, ya que la ganadería es la principal actividad productiva y fuente de ingresos. En las últimas décadas la investigación y desarrollo tecnológico en técnicas reproductivas de alpacas ha ganado gran importancia, desarrollando programas de selección y mejoramiento genético acelerado para incrementar la calidad de la fibra y la productividad de las alpacas, para el establecimiento de núcleos genéticos élite (NGE), aplicando biotecnologías reproductivas con el propósito de obtener y propagar animales genéticamente superiores en bienestar de la zona alto andina (Miragaya et al., 2006; Vivanco, 2002). Sin embargo, los avances logrados son escasos aún en comparación con las otras especies domésticas, éstos a razón de las características reproductivas particulares de los camélidos; lo que hace necesario realizar más trabajos para lograr un mejor entendimiento de las características reproductivas en estas especies.

Las biotecnologías reproductivas son utilizadas tanto en machos como en hembras: en machos el manejo del semen fresco, refrigerado y congelado para la inseminación artificial. En hembras se viene realizando diversos trabajos relacionados a la sincronización folicular, superovulación, recuperación y transferencia de embriones, producción in vitro de embriones y la técnica de ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoide).

La utilización de la hembra como recurso genético a través de la transferencia embrionaria tiene una mayor efectividad en la diseminación de genes superiores cuanto mayor es el número de descendientes obtenidos por hembra selecta por año (Vivanco, 1999), ésta depende de la capacidad de la especie para poder ser programada repetidas veces durante las distintas estaciones del año para superovulación y colección embrionaria y la habilidad de cada hembra para la producción en forma sostenida de embriones transferibles a través de las colecciones.

El objetivo del presente trabajo, fue evaluar la eficiencia de la respuesta ovárica y producción embrionaria en alpacas superovuladas en forma consecutiva.

CAPITULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Caracterización de la alpaca huacaya

El Perú cuenta con una gran población de camélidos sudamericanos, siendo la alpaca el recurso genético de mayor población con 3'685,516 alpacas que representa el 87% de la población mundial según el último Censo Nacional Agropecuario. La alpaca presenta dos variedades Huacaya y Suri; de la población total destaca la raza Huacaya con el 80.4% sobre la raza Suri con sólo el 12.2 % (INEI, 2012). Ambas razas se separan fácilmente por sus características fenotípicas, no hay diferencias en el peso, ni de las crías al nacer (de 7,5 a 8 kg) ni de los ejemplares adultos, que pesan alrededor de 70 kg en los machos y 65 kg en las hembras (Fernández-Baca, 2005).

Los ejemplares de la raza Huacaya tienen una apariencia redondeada y voluminosa. La fibra de la Huacaya crece en forma perpendicular al cuerpo de la alpaca, posee densidad, suavidad, lustre, rizos (*crimp*) que le

confieren un aspecto esponjoso, las mechas de fibra son más cortas y opacas en comparación con la suri, con ausencia de suarda. La fibra de la suri, en cambio, crece en forma paralela al cuerpo en dirección al piso, formando rulos independientes a través de todo el cuerpo, posee densidad, suavidad, y lustre mucho más notorios que en la de la Huacaya, confiriéndole un aspecto sedoso y brillante. Como en la otra raza, en la Huacaya también se presentan gran variedad de coloración de su pelaje, colores que totalizan 22 capas. Su lana está integrada por entre 90 a 110 hebras/mm² (Fernández –Baca et al., 1973).

1.2 Anatomía reproductiva de la hembra

El sistema reproductivo de los camélidos presenta varias características anatómicas y fisiológicas únicas que es necesario entender, así como su comportamiento sexual. Estas peculiaridades frecuentemente son la causa de un pobre rendimiento de crías comparado con las otras especies domesticas convencionales (Brown, 2000).

El labio de la vulva está en posición ligeramente vertical aproximadamente de 4 a 6 cm ventral al orificio anal, la abertura vulvar es de 3- 5 cm de largo, la profundidad del vestíbulo (de la vulva al himen) es aproximadamente 3 a 4 cm. que continúa con la vagina cuya longitud varía de 15 a 25 cm y de 5 cm de diámetro aproximadamente llegando hasta el orificio externo de la cérvix que continúa con los pliegues con forma anular o espiral irregular cuyas capas epiteliales constan de células cuboidales y no hay glándulas de la mucosa cervical (Fowler y Bravo, 2010).

El cuerpo uterino es corto (3 a 5.5 cm) y se asienta en el canal pélvico o en el borde pélvico interno en estado no grávido, cuenta con dos cuernos separados por un septum, que miden alrededor de 8 cm de largo cada uno. (Sumar, 1983). La mucosa uterina es similar al de otras especies, consta de una columna de estrato epitelial, el tejido fibroso de la submucosa es más denso que el de la yegua y las glándulas uterinas son pocas y pequeñas, estas glándulas no se encuentran en la submucosa cervical (Fowler y Bravo, 2010).

Las puntas de los cuernos uterinos en alpacas y llamas son romas y redondas, sujetos a las paredes abdominal y pélvica por los ligamentos anchos (Brown, 2000). El cuerno uterino izquierdo es usualmente más largo que el derecho (Tibary y Anouassi, 1997) y esta diferencia es mayor en hembras multíparas por que el 98% de todas las preñeces ocurren en el cuerno izquierdo (Fernández –Baca et al., 1973). Cada cuerno uterino finaliza en un largo (10-20 cm) y tortuoso oviducto, ambos oviductos son grandes y están enrollados, uniendo el cuerno uterino a la bursa ovárica (Sumar, 1983). Hay una prominente papila en la unión uterotubal, que tiene un esfínter bien definido en el istmo, sobresaliendo del tubo uterino al útero (Tibary y Memon, 1999). Las fimbrias están contenidas en la bursa, cerca al ovario. La bursa ovárica está formada por un pliegue del mesosalpinx, en alpacas y llamas es larga, 2.5 cm×2.5 cm×5 cm, y envuelve completamente al ovario (Sumar y Adams, 1997; Fowler y Bravo, 2010).

Los ovarios de la llama y alpaca son redondos y ovals, de forma globular irregular, con una textura irregular y firme a la palpación (Sumar, 1983). El tamaño del ovario varía marcadamente dependiendo de las estructuras presentes en el ovario pero es aproximadamente (1.5-2.5) cm×1.2 cm×1.0 cm en alpacas y llamas (Sumar y Adams, 1997; Fowler y Bravo, 1998). Los folículos están característicamente ordenados a lo largo de la periferia del ovario (Tibary y Anouassi, 1997; Tibary y Memon, 1999; Tibary, 2001b). Los folículos más grandes de 4 mm de diámetro y cuerpos lúteos se proyectan predominantemente a la superficie del ovario (Adams et al., 1989; Tibary y Anouassi, 1997). Los folículos más grandes de 12 mm son considerados patológicos (Hafez y Hafez, 2002). Los folículos más grandes de 2 mm pueden ser detectados usando ultrasonografía transrectal, particularmente cuando se usa un transductor de alta frecuencia (7.5 o 8 MHz) (Bourke et al., 1992a; Tibary, 2001b). El útero incrementa su tonicidad y hay presencia de edema durante la fase folicular y está relajado y homogéneo durante la fase luteal (Tibary, 2001b).

1.3 Comportamiento sexual de la alpaca hembra

Los patrones de comportamiento sexual de los camélidos sudamericanos son complejos (Adams et al., 1989) y la variabilidad puede estar relacionada a su localización geográfica, grado de domesticación y estructura social del hato (Novoa, 1970).

1.3.1 Pubertad

La valoración de la pubertad en las hembras de camélidos sudamericanos es dificultoso por la falta de un ciclo estrual (Fowler y Bravo, 2010). Sin embargo la mayor parte de las hembras alpaca muestran receptividad sexual entre los 12 y 14 meses de edad, a pesar de haberse comprobado que la actividad ovárica (presencia de folículos con un diámetro superior a los 5 mm) se inicia a edades más tempranas. La aparición de la pubertad está supeditada a las condiciones ambientales, especialmente a la situación nutricional. Así, la pubertad se produce cuando el animal alcanza el 60% del peso corporal de un adulto, lo que supone unos 33-36 kg (Sumar, 1985; Smith et al., 1994). La tasa de concepción y el mantenimiento de la preñez son afectados por el peso de la hembra al empadre (Sumar, 1999). Es posible alcanzar bajo condiciones de buena nutrición, un peso corporal de 33 kg para la mayoría de tuis (Sumar, 1985). Sin embargo, en los ambientes pastoriles más pobres del Perú, las alpacas hembras no maduran tan rápido y generalmente no se reproducen hasta los 2 años de edad. Es también común la práctica de reproducción en llamas hembras de 2 años de edad (Fernández-Baca et al., 1972a).

1.3.2 Estación reproductiva

Las alpacas y llamas son consideradas como reproductores no estacionales. En Perú, ha sido demostrado que la actividad folicular ovárica en alpacas ocurre durante todo el año y la estación (fotoperiodo, precipitación o temperatura) no afecta el número de folículos >6 mm

observados en los ovarios (Bravo y Sumar, 1989). Sin embargo, el empadre y el parto son usualmente restringidos por los criadores a los meses lluviosos y cálidos de verano en Sudamérica (diciembre-abril) cuando la alimentación es probablemente más abundante y de mejor calidad (San Martín et al., 1968).

En estudios con alpacas y llamas en su hábitat natural, donde los machos y hembras conviven juntos todo el año, se observa que la actividad sexual es estacional; en donde la época de empadre ocurre durante la época lluviosa (diciembre-marzo) coincidiendo con la mayor disponibilidad de pastos (San Martín et al., 1968; Sumar, 1996). Se desconocen los factores que causan el inicio y el término de la actividad sexual bajo condiciones naturales, además del efecto inhibitorio del libido del macho resultando de la exposición continua a las hembras; sin embargo, la actividad sexual en estos machos es reanudado si ellos son introducidos a un nuevo hato de hembras (Fernández-Baca et al., 1972b). Factores ambientales, además de la estimulación visual y olfatoria, podrían influir a través del sistema nervioso central (Brown, 2000; Hafez y Hafez, 2002).

Por otro lado, cuando las alpacas hembras se mantuvieron separadas de los machos y se permitió la cópula solo una vez al mes, ambos sexos tuvieron actividad sexual durante todo el año. Las tasas de ovulación y fertilización, tanto como con la sobrevivencia del embrión, no se vieron afectadas de manera significativa por la estación del año (Fernández-Baca et al., 1972a).

Las tasas de receptividad, ovulación, fertilización y supervivencia embrionaria durante el período sin empadre en alpacas son similares a los que se observó en la estación normal de empadre en el Perú (Fernández-Baca et al., 1972a). Las tasas de concepción logrados en Nueva Zelanda en primavera no tuvieron diferencias significativas a los que se lograron en otoño (Knight et al., 1992). Aunque los camélidos pueden concebir y obtener una cría en cualquier época del año en América del norte, el empadre es evitado durante los meses más calurosos y durante el invierno (Smith et al., 1994; Sumar y Adams, 1997; Tibary y Memon, 1999). Las alpacas han sido empadradas exitosamente durante todo el año en Australia, con una tendencia de mayores tasas de preñez en verano (Vaughan et al., 2003).

1.3.3 Comportamiento sexual en el estro

Diferente a la mayoría de especies domésticas, los CSA hembras son poliéstricas irregulares. Las llamas y alpacas hembras no preñadas muestran prolongados períodos de comportamiento estral, durando más de 36 días después de su primera monta (San-Martin et al., 1968; England et al., 1971). Estos periodos de receptividad son interrumpidos por episodios muy cortos de anestro, que no pasan de 48 h (San-Martin et al., 1968). La intensidad del estro (el tiempo tomado por una hembra para asumir la posición de monta) se reduce en respuesta a la duración previa de exposición al macho, y por el avance de la época (England et al., 1971).

Parece ser que los camélidos son los únicos que no tienen períodos de comportamiento estral, asociados con distintos episodios o incrementos en actividad del estradiol, como ocurre en la ovulación espontánea de animales tales como ovejas y vacas, o en algunas especies de ovulación inducida como la coneja. Se podría argumentar que en camélidos el rápido reemplazo de folículos dominantes que prevalece por relativos períodos largos de tiempo es probable que asegure casi niveles ininterrumpidos de estrógeno que facilita la continua receptividad a los machos. (Bravo et al., 1990a).

De los pocos estudios de cambios endocrinos que ocurren durante la cópula (Sumar et al., 1988; Bravo et al., 1990b), es claro que la concentración de estradiol en este tiempo es elevado a niveles ($10\text{-}20\text{ pg ml}^{-1}$) equivalentes a valores máximos producidos en asociación con el desarrollo de folículos grandes. Así, es posible que el episodio de liberación de estradiol sea suficiente para mantener una sensación continua en los centros neurales que controlan el comportamiento sexual, siempre que los períodos entre picos sucesivos no sean considerables (quizás 1-2 días). Los períodos cortos de anestro que ocurren en las hembras no preñadas puede ser explicados por la asincronía ocasional entre sucesivas ondas de crecimiento folicular, tal que la iniciación de una nueva onda de crecimiento folicular, y su asociada producción de estradiol, es retrasada lo suficiente para que ocurra la desensibilización de los centros neurales (Brown, 2000).

Hay una pequeña relación entre la receptividad sexual, el tamaño del folículo y la concentración de estrógeno en plasma en hembras sin empadre (Bravo et al., 1991; Pollard et al., 1994; Vaughan et al., 2003). Las hembras son receptivas usualmente al empadre a pesar del estado de desarrollo folicular (Sumar et al., 1993) y la negativa de una hembra al macho no necesariamente indica ausencia de un folículo maduro (Bravo, 1994).

Cambios en los genitales externos y la citología vaginal no son buenos indicadores de la receptividad sexual o estado ovárico en camélidos. Edema o alargamiento de los labios vulvares son discretos y visto solo en algunas hembras, particularmente en las primerizas. No hay una correlación entre las proporciones de las células epiteliales vaginales superficiales, intermedias y parabasales y el estado folicular determinado por ultrasonografía o niveles séricos de estradiol (Ferrer et al., 1999).

1.3.4 Comportamiento del empadre

El comportamiento de empadre mostrado por un camélido hembra sexualmente receptiva puede ser dividido en fases de cortejo y de cópula. La fase de cortejo ocurre cuando el macho persigue activamente a la hembra y puede solo durar unos pocos segundos o más de 10 min, pero los intentos más largos de 4 min usualmente no resultan en empadre (England et al., 1971). La longitud de esta fase puede ser influenciada por el nivel de libido y la fuerza del macho. Una hembra sexualmente receptiva puede asumir la posición de cópula en decúbito ventral cuando se aproxima

un macho o en proximidad del empadre de otra pareja (Novoa, 1970). Ocasionalmente, algunas hembras cortejan a otras hembras o hembras pueden cortejar a un macho durante el empadre donde puede haber una larga cadena de hembras en decúbito ventral sobre otra y sobre un macho empadrando a una hembra (Novoa, 1970; Smith et al., 1994; Sumar y Adams, 1997).

La fase copulatoria ocurre en decúbito ventral con las piernas ubicadas debajo del cuerpo (England et al., 1971). Las hembras asumen una actitud pasiva durante la cópula y pueden cambiar de posición y reclinarse en decúbito lateral (Sumar y Adams, 1997). El macho cubre a la hembra, sujeta sus hombros con sus codos, y su metatarso descansa en el suelo, lateral al de las hembras (Novoa, 1970). Los machos muestran su excitación con temblores de orejas, movimientos de cola de arriba abajo, fosas nasales dilatadas y comprimidas y por vocalización (Novoa, 1970). La vocalización de los machos ("sonido gutural") es reportado como parte de un aspecto integral de liberación de LH preovulatorio (Bravo, 1994).

Durante la cópula, el pene del macho penetra la cérvix de la hembra, y deposita el semen durante múltiples eyaculaciones en ambos cuernos uterinos mediante movimientos de golpes suaves (Bravo, 1994). La cópula usualmente dura 20-25 min, con un rango de 5-65 min (England et al., 1971; Vaughan et al., 2003). La duración de la cópula está influenciada por el macho y por la presencia de otros animales (England et al., 1971).

No hay relación entre el tiempo de cópula y la inducción de la ovulación (Fernández-Baca et al., 1970b). Las hembras que fueron empadradas por solo 5 min mostraron similar rangos de ovulación como aquellas que no tuvieron servicios interrumpidos. Knight et al. (1992) no encontró diferencia en la duración de la cópula entre alpacas que han concebido (15.6 ± 2.0 min) y aquellas con problemas para concebir (14.33 ± 6.4 min).

1.3.5 Comportamiento sexual durante la fase luteal

Hay una cercana relación entre la función del cuerpo lúteo y la respuesta de comportamiento de hembras en la presencia de machos (Fernández-Baca et al., 1970b; Fowler y Bravo, 2010). En camélidos sudamericanos, las hembras no receptivas rechazan fuertemente al macho cuando se les pone juntos en un corral y pueden escaparse del macho o saltar, golpear y gritar (Fowler y Bravo, 2010). Estas acciones ocurrieron más frecuentemente en hembras empadradas y fue más característico la presencia de un cuerpo lúteo antes que la presencia de un folículo antral o luteinizado (Pollard et al., 1994). Alpacas hembras sexualmente inexpertas son más probables para patear e intentar escapar pero menos probables para escupir o amenazar al macho comparado con las hembras experimentadas (Vaughan, 2003).

1.4 Fisiología reproductiva de la hembra

1.4.1 Foliculogénesis

En la reserva de folículos primordiales, formados durante la vida fetal o poco después del nacimiento, algunos comienzan a crecer y no dejan de hacerlo durante toda la vida o por lo menos hasta que dicha reserva se agote. Cuando algún folículo sale de esta reserva, sigue creciendo hasta la ovulación o hasta que degenera, como ocurre con la mayor parte de los folículos. El folículo de mayor tamaño se encarga de casi toda la secreción de estrógeno por el ovario durante el estro; dicha secreción disminuye con rapidez al momento del pico de la hormona luteinizante (Hafez y Hafez, 2002).

En el crecimiento folicular intervienen la proliferación y la diferenciación de células de la teca y de la granulosa inducidas por hormonas, lo que finalmente causa un incremento en la capacidad de los folículos de producir estradiol y de reaccionar a las gonadotropinas. La producción de estradiol determina cual folículo adquirirá los receptores de LH necesarios para la ovulación y la luteinización. Las perturbaciones en la respuesta de la granulosa y teca a las señales gonadotrópicas interrumpen el crecimiento folicular e inician la atresia (Hafez y Hafez, 2002).

La foliculogénesis en alpacas es completada alrededor de los 10 meses de edad pero las hembras jóvenes generalmente no son receptivas a los machos hasta los 12-14 meses de edad (Brown, 2000).

1.4.2 Dinámica folicular

Varios estudios usando variedad de metodologías tal como laparoscopia, ultrasonografía y análisis de hormonas en plasma y orina (Adams et al., 1989; Bravo y Sumar, 1989; Bravo et al., 1990a) han revelado coincidencias en los patrones de la onda del crecimiento folicular en los ovarios de alpacas y llamas.

Diversos estudios han mostrado que las llamas (Adams et al., 1989), alpacas (Vaughan et al., 2004) y vicuñas (Agüero et al., 2001a; Miragaya et al., 2004) sexualmente maduras que no han sido empadradas exhiben continua renovación de folículos en crecimiento definido como ondas foliculares. Una relación inversa existe entre el número de folículos antrales detectados por ultrasonografía y el diámetro del folículo más grande (Adams et al., 1989, 1990; Agüero et al., 2001a; Miragaya et al., 2004; Vaughan et al., 2004). Por conveniencia, el patrón de cambios en el crecimiento folicular ha sido descrito en tres fases, fase de crecimiento, fase de madurez (momento en el que se alcanza el diámetro de folículo preovulatorio: 7–12 mm), y la fase de regresión, siendo la duración media de cada una de ellas de 4 días en la alpaca (Bravo et al, 1990a).

El reclutamiento de un grupo de folículos es seguido por la emergencia sincronizada de folículos antrales de 2-3 mm de diámetro, de crecimiento de 4-5 mm de diámetro, llegando un folículo a ser dominante (y a veces dos en alrededor del 10% de los animales) con diámetro >7.0 mm (Adams et al., 1989; Bravo et al., 1990a), y los otros regresionan por atresia.

El folículo dominante activo regula el número y diámetro de los folículos presentes en ambos ovarios, mientras mantiene su dominancia, que se estima debe estar alrededor de los 5 días; esta regulación de ondas foliculares es probablemente a través de la secreción de la inhibina del folículo dominante que inhibe los centros neurales involucrados en la secreción de gonadotropinas (Tibary y Memon, 1999; Brown, 2000). Si la monta no ocurre, el folículo dominante regresiona en 3-5 días y una nueva onda de folículos comienza su rápida fase de crecimiento. Un nuevo folículo llega a ser dominante en 2-3 días (Bravo et al., 1990a; Bravo, 1994).

Una correlación positiva entre el tamaño del folículo y el 17β -estradiol plasmático (estradiol), sulfato de estrona y sulfato de estrona urinario ha sido descrita en alpacas (Bravo et al., 1990a; Aba et al., 1995; Vaughan, 2001) y en llamas (Bravo et al., 1990a; Bravo, 1994; Aba et al., 1995; Chaves et al., 2002). El pico de la concentración de estradiol plasmático coincide con un folículo de tamaño máximo, 10-13 días después del comienzo del crecimiento folicular en llamas (Chaves et al., 2002) y 8 días en alpacas (Vaughan, 2001). Los niveles de progesterona plasmática permanecen debajo de 1 ng/ml en la mayoría de camélidos no empadrados (Bravo et al., 1990a; Aba et al., 1995;). En algunos casos, los folículos hemorrágicos anovulatorios pueden llegar a ser luteinizados y producir niveles significativos de progesterona (Tibary y Memon, 1999; Tibary, 2001b).

Diversos estudios reportaron rangos de crecimiento folicular de 0.5-0.8 mm/día (Adams et al., 1989) a 0.9 mm/día (Chaves et al., 2002) en

llamas, 0.43 mm/día en alpacas (Vaughan et al., 2004) y 1.8 mm/día en vicuñas (Agüero et al., 2001a; Miragaya et al., 2004). La tasa de crecimiento de los folículos dominantes es consistente sobre los primeros 10 días después de la emergencia en alpacas (Vaughan et al., 2004).

Incrementos periódicos en la hormona folículo estimulante (FSH) responsable de provocar la onda folicular emergente en ganado no ha sido demostrado en llamas y alpacas (Adams, 1999). La lactación reportó depresión en el desarrollo folicular probablemente por los niveles elevados de prolactina. El intervalo entre las ondas foliculares y el máximo tamaño de los folículos dominantes fueron reducidos en la lactación comparada a las llamas no lactantes (Adams et al., 1990).

Los folículos dominantes (≥ 6 mm de diámetro) son igualmente distribuidos entre los ovarios de alpacas y llamas (Bravo y Sumar, 1989; Bravo et al., 1990a; Bourke et al., 1992a; Vaughan et al., 2004), sin embargo, la actividad folicular del ovario en camélidos no necesariamente alterna entre ovarios de una onda folicular a la siguiente (Adams et al., 1990; Bourke et al., 1992a; Vaughan et al., 2004). Adams (1998) observó los dos ovarios como una unidad controlada por un mecanismo más sistémico que local.

Durante la atresia folicular, ocurre un rápido reemplazo del folículo dominante en 2-3 días siguiendo la primera reducción de tamaño de ese folículo dominante (Vaughan, 2001). El crecimiento y la regresión de folículos dominantes sucesivos pueden coincidir en camélidos

sudamericanos por 1-4 días, porque mientras un folículo grande está regresionando, otro está por llegar a ser dominante. Adicionalmente, una nueva onda folicular y el reclutamiento de un nuevo folículo empiezan inmediatamente después del empadre y la ovulación (Adams et al., 1990). Cambios en la frecuencia de pulsaciones de la hormona luteinizante (LH) presumiblemente regula la actividad folicular en camélidos sudamericanos como la presencia de progesterona reduce intervalos entre ondas foliculares después de la ovulación y durante la preñez (Adams et al., 1990).

El intervalo entre ondas es definido como el tiempo en días, entre la emergencia de folículos dominantes sucesivos, siendo aproximadamente 20 días en llamas (Adams et al., 1990), rangos de 12 a 22 días en alpacas (Vaughan et al., 2004) y 4 días en vicuñas (Agüero et al., 2001a; Miragaya et al., 2004). Bravo y Sumar (1989) y Bravo et al. (1990a) reportaron un intervalo de 11-12 días en alpacas y llamas entre folículos grandes sucesivos que alcanzan 8.0 mm de diámetro (es decir, tamaño capaz de ovular). Folículos grandes no ovulatorios de mayor diámetro tienen un tiempo de vida más largo (Tibary y Anouassi, 1997; Vaughan et al., 2004). Esto es sostenido por la descripción de los folículos quísticos, con un diámetro más grande de 12 mm que sobrevivieron desde los 17 a 31 días (Bravo et al., 1993), y folículos hemorrágicos que fueron al menos de 13 mm de diámetro y sobrevivieron por 25 días o más (Adams et al., 1991b). La variación en el intervalo entre ondas puede ser debido a las diferencias entre las especies de camélidos, localización geográfica (mayor altitud en

Perú contra menor altitud en América del Norte), variaciones de estación, métodos de examinación y el número de animales incluidos en cada experimento.

1.4.3 Ovulación

Las alpacas son animales con ovulación inducida, muestran una alta variabilidad individual en los síntomas, la duración y la regularidad del estro o periodo de receptividad a los machos, su fase folicular no termina en la ovulación y posterior a la fase lútea a menos que un estímulo externo, como la cópula o la aplicación de una hormona exógena induzca la ovulación (Vivanco et al. 2011).

Los estímulos neurales, que influyen en el eje neuroendocrino en camélidos para inducir la emergencia de LH en hembras, incluyen la penetración del pene a la cervix, “sonido gutural” y contacto físico (Fernández-Baca et al., 1970b; Bravo, 1994;), como también la presencia de un factor de inducción a la ovulación en el semen (Adams y Ratto, 2001).

El tiempo estimado de ovulación después de la copula está en el rango de 26 a 42 h (San-Martin et al., 1968) pero evaluaciones más frecuentes con examinaciones de ultrasonido reveló que el 96% de llamas ovularon en el segundo día después del empare. El primer incremento significativo de los niveles plasmáticos de LH se produce entre 15 y 40 min después del inicio del coito, como consecuencia de un reflejo neuroendocrino (Adams et al., 1989).

La descarga de LH como respuesta a la cópula está condicionada por el tamaño del folículo dominante (Bravo et al., 1991). Cuando los folículos tienen un diámetro entre 4 y 5 mm, la cantidad de LH secretada es muy inferior y no se produce la ovulación. Esta situación parece ser consecuencia de que los folículos de pequeño tamaño no son capaces de producir suficiente cantidad de estradiol para sensibilizar al eje hipotálamo hipofisario (Bravo et al., 1991).

Por otro lado, cuando folículos en regresión están presentes en el tiempo de monta, la cantidad de LH liberada es similar a las hembras con folículos en crecimiento o maduros (Bravo et al., 1991). Diferente a la LH, concentraciones de FSH en ninguna especie evidentemente no es afectada por la copula y no es relacionada al tamaño del folículo, aunque los niveles (promedio de 0.96 ng ml^{-1}) de esta hormona fluctúan durante los ciclos de crecimiento del folículo (Bravo et al. 1991).

Las ovulaciones tienen lugar en ambos ovarios con una frecuencia similar, a pesar de que la mayor parte de las gestaciones se localicen en el cuerno izquierdo. Tampoco se ha podido comprobar que el ovario de procedencia del ovocito tenga ningún efecto en la probabilidad de que se produzca una gestación (Vaughan et al., 2004).

La ocurrencia de la ovulación siguiente a la cópula que está influenciada por el tamaño de los folículos ováricos se puede explicar porque el 20% de hembras fallan en ovular después de servicios únicos o múltiples por machos enteros o vasectomizados. Bravo et al. (1991)

encontraron en alpacas y llamas que la ovulación no ocurrió en ninguna hembra con folículos ováricos <7.0 mm de diámetro en el tiempo de cópula. La ovulación ocurrió cuando los folículos fueron ≥ 7.0 mm de diámetro. Cuando la regresión de folículos estuvo presente en el tiempo de monta, ocurrió la luteinización de estas estructuras, más no la ovulación. En estas instancias, los folículos luteinizados sobrevivieron por alrededor de 5 días y retardaron el desarrollo de un nuevo folículo dominante por 5 a 7 días (Bravo et al., 1991). Así, en los camélidos adultos, parece que mientras la incidencia del comportamiento estral es independiente del desarrollo folicular, la inducción de ovulación que resulta en función luteal normal no lo es.

La influencia del tamaño del folículo en la ovulación puede ser relacionada a su habilidad para secretar suficiente estrógeno para sensibilizar el sistema hipotálamo-pituitaria para producir LH (en respuesta a la cópula), que en cantidades adecuadas causa la ovulación (Bravo et al., 1991). Ciertamente, existe una correlación positiva entre tamaño de folículo y concentraciones de estrógeno (Bravo et al., 1990a). Cuando pequeños folículos en el ovario (4-5 mm) están presentes en el tiempo de monta, la cantidad de LH liberada es insuficiente para inducir ovulación y es mucho menos que lo producido por hembras con folículos más grandes (6-12 mm) que han ovulado. Por otro lado, cuando folículos en regresión están presentes en el tiempo de monta, la cantidad de LH liberada es similar a las hembras con folículos en crecimiento o maduros (Bravo et al., 1991). Aba y Forsberg, (1995), sin embargo, no observaron ninguna correlación

entre el estradiol en plasma (rango de 5–41 pmol/L) y la cantidad de LH liberada después de la estimulación de GnRH (0.2µg/kg PV) en alpacas y llamas.

Después de la cópula, el elevado nivel de estradiol permanece esencialmente sin cambios por al menos las próximas 18 h y no decrece marcadamente hasta alrededor de las 22 a 48 h (Bravo et al., 1990b). El patrón de liberación de LH en llamas y alpacas es similar a lo que ocurre en otras especies de ovulación inducida y es iniciada por respuesta a la estimulación de cópula (Brown, 2000).

Concentraciones de LH en plasma sube marcadamente en 15 min después de iniciada la cópula, seguido por el incremento de LH preovulatorio con picos durante 2 h (Bravo et al., 1991). Los niveles circulantes de esta hormona luego declinan por un periodo de 5-6 h, para alcanzar niveles basales a las 7 h (Bravo et al., 1990b). Posteriores empadres (dentro de las 24 h de la monta inicial) no parecen estimular la liberación adicional de LH (Bravo et al., 1992). England et al., (1969) encontraron que el contenido de LH en la glándula pituitaria fue significativamente más bajo 4 días después del empadre y retornó a niveles cercanos al pre-ovulatorio 8 días después del empadre. Las concentraciones de LH no difieren en amplitud o duración entre las hembras que concibieron y aquellas que fallaron para concebir (Bravo et al., 1990b; Abo y Forsberg, 1995).

No hay una relación significativa entre el tamaño folicular y el tiempo de ovulación posterior al empadre (Adams et al., 1990; Sumar et al., 1993). Adams et al. (1990) encontraron que la tasa media de crecimiento del folículo del empadre a la ovulación fue más grande para folículos de 7–9 mm de diámetro (0.6–1 mm/día) comparado con folículos de 10–12 mm de diámetro (–0.3 a 0.2 mm/día).

El incremento de LH altera la estructura y la función del folículo pre-ovulatorio antes de la ovulación; provocando la maduración del ovocito, la alteración de la armonía de la célula del cúmulo y la ruptura de la pared folicular (Tibary, 2001a). La producción de esteroides ováricos cambia en el intervalo entre el pico de LH y la ovulación. En llamas, los niveles de estradiol en plasma permanecieron sin cambios en 11–12 pg/ml sobre las 18 h después del empadre, luego declinaron a las 22 h a 9 pg/ml y fue significativamente más bajo a las 28 h (6pg/ml) (Bravo et al., 1990b).

La ovulación espontanea, está definida como la ruptura del folículo, liberación de un ovocito y formación de un cuerpo lúteo normal (fase luteal normal) sin estímulo coital, es raro pero puede ocurrir en camélidos; un 3.5% del número total de los folículos ≥ 6 mm observados por laparoscopia en un largo estudio (Bravo y Sumar, 1989). Muchos casos registrados incluyen alguna forma de contacto con el macho. Varios investigadores han reportado la ocurrencia de ovulaciones espontáneas en camélidos pero no reportaron exposición a otros estímulos ovulatorios (England et al., 1969; Adams et al., 1990; Bourke et al., 1995a;).

Algunos folículos pueden sufrir luteinización antes de la ovulación espontánea, cuando no se ha encontrado estigma de ovulación presente durante la examinación (Bravo y Sumar, 1989; Pollard et al., 1994). Tibary y Memon (1999) no vieron ovulación en ausencia de coito, pero observaron luteinización de algunos folículos. La monta hembra–hembra, el estrés del manejo, o la manipulación del tracto reproductivo durante la ultrasonografía pueden contribuir a ovulaciones independiente de la cópula (Bourke et al., 1995^a). Otros no han observado ovulación espontánea durante la ultrasonografía transrectal (Chaves et al., 2002).

1.4.4 Actividad luteal

El crecimiento y regresión luteal en las hembras no preñadas han sido descritas para llamas y alpacas por varios autores (England et al., 1969; Adam et al., 1989; Bravo et al., 1991). Diferencias aparentes en la duración de la función luteal parece estar relacionada con la variación en el intervalo entre cópula y ovulación. Hay también alguna sugerencia que los cuerpos lúteos en el ovario derecho se someten a una regresión más rápida que aquellos del ovario izquierdo y este puede relacionar la predominante acción luteolítica local del cuerno uterino derecho (Brown, 2000).

El tamaño máximo reportado del cuerpo lúteo va entre 10 y 15 mm en alpacas y en llamas es alcanzado a los 7–9 días después del empadre y es acompañado con la producción de progesterona máxima (Adams et al., 1991a; Aba et al., 2000). La visualización del cuerpo lúteo por ultrasonografía transrectal es relativamente fácil 4 días después de la

ovulación. En general, los cuerpos lúteos son de ecogenicidad media con un hoyo central más ecogénico, sin embargo una proporción de ellos pueden presentar una cavidad central no ecogénica llena de fluido desde 3 a 8 mm de diámetro (Adams et al., 1991a). La producción de progesterona del cuerpo lúteo decrece desde alrededor de los 9 a 11 días después del empadre y el diámetro es reducido a la mitad a los 12 días después del empadre (Fernández-Baca et al., 1970a; Sumar et al., 1988; Adams et al., 1989). El tiempo de vida del cuerpo lúteo por lo tanto es de 8–9 días. Las hembras deberían ser sexualmente receptivas de nuevo aproximadamente a los 12–14 días después del empadre cuando no ocurre la concepción. Como en otras especies, también hay una alta correlación entre diámetro/peso luteal y concentraciones de progesterona en llamas y alpacas (Fernández-Baca et al., 1970a; Adams et al., 1991a).

Progesterona en el plasma de la sangre periférica y pregnanediol glucurónico urinario son medios simples de evaluación de la actividad secretora del cuerpo lúteo en camélidos; sus concentraciones cambian paralelo al tamaño del cuerpo lúteo (England et al., 1969; Fernández-Baca et al., 1970a; Bravo et al., 1991; Bravo, 1994). Una disminución de progesterona en plasma es notado 1–3 días antes de la disminución morfológica en el diámetro de cuerpo lúteo. Los niveles de progesterona circulante mayores a 2 ng/ml (6.4 nmol/L) son considerados una fuerte indicación de la presencia de un cuerpo lúteo maduro y funcional (Adams et al., 1991a). Sumar et al. (1988) definieron arbitrariamente el intervalo de tiempo de la fase luteal cuando la progesterona en plasma fuese mayor a

1nmol/L (0.32 ng/ml). La progesterona en leche llegó al máximo 3 días después del empadre en alpacas, y retornó a niveles bajos en los días 10–11 después de la unión cuando no ocurrió la concepción.

Las fases luteales cortas han sido descritas en llamas y alpacas. Sumar et al. (1988) reportaron una fase luteal de solo 4 días en 2 hembras de un grupo de 12. Estudios de ultrasonografía mostraron que los folículos en regresión (7–10 mm de diámetro) fallaron para ovular a pesar de una liberación normal de LH en respuesta a la cópula (Bravo et al., 1991). Estos folículos desarrollan tejido luteal con cavidades central grandes y con un tiempo de vida de aproximadamente 5 días. Los autores postularon que las células de la granulosa en folículos en regresión pueden tener la capacidad para la luteinización, pero han perdido la capacidad para secretar importantes factores hormonales para la ruptura del folículo. La luteinización de folículos (presencia de tejido luteal pero ausencia del estigma de ovulación) fue también evidenciado por laparoscopia en alpacas empadradas y no empadradas (Bravo y Sumar, 1989; Pollard et al., 1994).

1.4.5 Luteólisis

La prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) juega un rol esencial en la regresión luteal (Tibary y Anouassi, 1997; Skidmore et al., 1998). $PGF_{2\alpha}$ es secretado de manera pulsátil en alpacas, desde el endometrio no preñado a la circulación a través de las venas uterinas (Aba et al., 2000). El rol de la oxitocina en la regresión luteal en camélidos todavía no ha sido determinado. La actividad luteolítica del cuerno uterino derecho es local y

afecta solo al cuerpo lúteo del ovario derecho mientras el cuerno uterino izquierdo tiene efecto local y sistémico, afectando un cuerpo lúteo en cualquiera de los dos ovarios (Fernández-Baca et al., 1979). Esta diferencia en la actividad luteolítica entre los cuernos uterinos puede ser explicada por una diferencia en la anatomía vascular del útero, ovarios y oviductos en camélidos hembras. En un estudio de úteros adultos y fetales de camélidos, la arteria uterina derecha fue más larga en la mayoría de los casos (>90%) y las ramificaciones cruzaron para suministrar $\text{PGF}_{2\alpha}$ al cuerno izquierdo. La vena uterina derecha también fue más larga y drenó mucho al cuerno izquierdo, pero la vena uterina izquierda no drenó al cuerno derecho. Fue postulado que el cuerno izquierdo puede inducir la luteólisis de un cuerpo lúteo en el ovario derecho a través de un sendero local veno-arterial (Del Campo et al., 1996).

Los cambios en la tasa de secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ha sido estudiado en camélidos a través de la medida de su principal metabolito estable, 13,14 dihidro-15-keto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ (PGFM) (Skidmore et al., 1998; Aba et al., 2000;). Las concentraciones de PGFM en plasma son basales (200 pmol/L) hasta la fase luteal temprana. Incrementos ligeros en PGFM ocurren 7 días después del empadre en llamas y empieza a declinar la progesterona por la tarde del día 8, hasta caer rápidamente para alcanzar niveles basales alrededor de los días 14–15 después de la ovulación (Adam et al., 1989; Aba et al., 2000). Desde el día 8 o 9 al día 12 o 13 después del empadre, pulsos repetidos de PGFM sube a un pico promedio de amplitud de 800–1200 pmol/L en llamas y 600 pmol/L en alpacas (Sumar et al., 1988; Aba et

al., 2000). En llamas, el 35% de $\text{PGF}_{2\alpha}$ liberada ocurrió en el día 8 y 9, y el 65% entre los días 10 y 12 cuando progesterona ha caído a menos de 1 nmol/L (Aba et al., 2000). Frente al declive de concentraciones de progesterona, el crecimiento folicular empieza de nuevo, resultando en el incremento de la secreción de estradiol y en la inducción del estro, que ha sido observado que sucede de nuevo por el día 12 (Fernández-Baca et al., 1970a).

Es interesante notar que, al menos en alpacas, parece haber un efecto luteolítico diferencial entre los dos cuernos uterinos, como se demostró en un estudio incluyendo una histerectomía parcial (Fernández-Baca et al., 1979). Cuando el cuerno uterino derecho fue removido quirúrgicamente en hembras no preñadas con un CL en el ovario derecho, solo un pequeño retraso resultó en la regresión luteal. Sin embargo, cuando el cuerno uterino izquierdo fue removido en hembras con un CL en el ovario izquierdo, o uno en cada ovario, el CL en el ovario izquierdo persistió y produjo progesterona, mientras que en el ovario derecho regresionó en el tiempo esperado de luteólisis (Fernández-Baca et al., 1979). Estas observaciones han llevado a la conclusión que la actividad luteolítica en el cuerno uterino derecho es solo local en su efecto, mientras que en el cuerno uterino izquierdo actúa local y sistemáticamente (Fernández-Baca et al., 1979). Es igualmente curioso que más del 95% de preñeces exitosas en alpacas y llamas se implanten en el cuerno uterino izquierdo, sin embargo 50% de preñeces son sostenidas por un CL en el ovario derecho (Fernández-Baca et al., 1979).

1.5 Tecnologías reproductivas asistidas

1.5.1 Sincronización de la dinámica del crecimiento folicular.

Es importante entender la dinámica folicular de la alpaca, con la finalidad de controlar eficientemente la sincronización de la onda folicular. La ecosonografía es utilizada para seguir el desarrollo folicular mediante la ecografía. Es recomendable seguir la onda folicular durante al menos 14 días, así determinar la emergencia de las ondas foliculares. (Vivanco, 2013).

En alpacas se ha tratado de controlar el ciclo ovárico con la inducción de una fase luteal artificial con la aplicación de progestágenos para iniciar una nueva onda folicular unos 5 a 7 días después de la finalización de la fase lútea inducida (Alberio y Aller, 1996; Chaves et al, 2002), o por la ablación del folículo dominante, ya sea por medios hormonales o mecánicos (Ratto et al., 2003). La progesterona secretada durante una fase luteal o durante la gestación altera la dinámica de crecimiento folicular, reduciendo el tamaño alcanzado por el folículo dominante y acortando la duración de la oleada en las llamas (Adams et al., 1989).

La administración de 50 mg diarios de progesterona durante 13 días consecutivos, altera la dinámica de crecimiento folicular y provoca el inicio de una nueva oleada a los 7 días de finalizar el tratamiento (Alberio y Aller 1996). Otros autores han comprobado que la administración conjunta de 25 mg de progesterona y 1 mg de 17 β -estradiol provocan un efecto similar,

apareciendo un nuevo folículo dominante a los $7,7 \pm 0,5$ días de la conclusión del tratamiento (Ratto et al., 2003).

La aplicación de dispositivos intravaginales impregnados con 0,33 g de progesterona (CIDR) durante 7 días provocó la supresión del crecimiento folicular por encima de los 7 mm y la aparición de una nueva oleada de crecimiento folicular a los $5,0 \pm 1,0$ días de la finalización del tratamiento (Chaves et al., 2002).

Otro método utilizado para la sincronización de las oleadas de crecimiento folicular se basa en la inducción a la ovulación del folículo dominante, lo que permite el desarrollo de un nuevo folículo dominante al cabo de $5,2 \pm 0,5$ días de tratamiento (Ratto et al., 2003)

1.5.2 Inducción a la ovulación

La ovulación en alpacas y llamas puede ser inducida con administración de hormonas exógenas con actividad de LH, tal como la gonadotropina coriónica humana (hCG), u hormonas que liberen LH tal como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Gamarra et al., 2007; Vivanco et al., 2011).

La respuesta a la GnRH, está condicionada por los niveles endógenos de estrógenos y el grado de desarrollo del folículo dominante. Para que se produzca la ovulación en las alpacas y las llamas, el folículo dominante deberá haber alcanzado un diámetro superior a los 7 mm y estar en fase de crecimiento. Cuando los folículos son de menor tamaño (4-5 mm), no se

produce la ovulación y si el folículo dominante está en fase de regresión se produce la luteinización del mismo (Bravo et al, 1991).

En un reciente estudio (Vivanco et al, 2013), cuya finalidad fue comparar la eficiencia en la inducción de ovulación de alpacas superovuladas con un agonista de GnRH (acetato de buserelina) y LH; donde se aplicó 0.0084 mg de acetato de buserelina a un grupo (10 alpacas) y 5 mg de LH al segundo grupo (11 alpacas), concluyendo que el uso de LH para la inducción de ovulación de alpacas superovuladas parece ser más aconsejable que el uso de un agonista de GnRH, por lo que se recomienda realizar comparaciones con mayor número de muestras.

Se ha comprobado que la inyección intramuscular de plasma seminal provoca la ovulación en llamas y alpacas (Sumar et al., 1988; Adams et al., 2001). Ello ha llevado a la identificación de una proteína, denominada factor inductor de la ovulación, presente en el semen de los camélidos.

En cuanto al estímulo ovulatorio en alpacas o llamas en tratamiento de superovulación, el empadre con machos enteros normales ha sido el estímulo principal utilizado, a veces en combinación con una inyección de hCG o GnRH (Bravo et al., 1992; Correa et al., 1997; Gamarra et al., 2007; Vivanco et al., 2010; Vivanco et al., 2011).

1.5.3 Superestimulación ovárica

La fisiología reproductiva en alpacas es compleja, por lo que es complicado inducir la superestimulación ovárica y la múltiple ovulación.

Esto es debido a la ausencia de espontaneidad para que la inducción de una fase luteal (porque ellos son animales de ovulación inducida). Como es el caso de rumiantes domésticos, los tratamientos de superovulación produjeron enormes variaciones en la respuesta individual, en términos del número de folículos estimulados y el número de CL visualizados por ecosonografía (Vivanco et al, 2011; Ponce, 2010).

La estimulación ovárica se debe iniciar durante una fase luteal y en ausencia de un folículo dominante, existiendo grandes variaciones en la respuesta superovulatoria de las donadoras en cuanto a calidad y cantidad de embriones (Del Campo et al, 2002; Vivanco et al., 2010).

1.5.4 Hormonas utilizadas para la superestimulación ovárica

El uso de gonadotropinas es constantemente aprovechado a fin de favorecer que los folículos alcancen el estado preovulatorio para lograr exitosos protocolos de superovulación y con ello potenciar la recuperación embrionaria; tal como en otras especies, en alpacas se han estudiado diversos protocolos para inducir el desarrollo folicular mediante el uso de pFSH y eCG.

Las estrategias iniciales de superovulación fueron imitando los protocolos de las ovejas, inyectando pFSH en una fase lútea artificial; Correa et al. (1997), utilizaron una fase progestacional de 12 días y se trató 4 alpacas con inyecciones de pFSH 3 días antes del final de la fase progestacional y 4 alpacas con eCG aplicadas en el extremo del tratamiento con progestágenos, obteniendo un promedio de 2.5 CL y 1,1 embriones

transferibles por donante tratada. Más tarde, el enfoque no fue utilizar una fase progestacional. Novoa et al. (1999) seleccionaron alpacas por ecosonografía con folículos de menos de 7 mm de diámetro, a las cuales aplicó de 500 a 750 U.I. de eCG en el día cero y hCG (700 a 1000 UI) en el día 5 en el momento del apareamiento; los embriones fueron colectados por laparotomía, el promedio de embriones recuperados por alpaca tratada fue de 1,7.

Gamarra et al., (2007) desarrollaron regímenes superovulatorios probando diferentes enfoques, para ello realizaron tratamientos con pFSH 3 días antes de finalizar una fase progestacional de 9 días y tratamientos sin fase progestacional, pero sin conocer la etapa del folículo en el inicio de las inyecciones de pFSH aplicadas de 5 a 7 días después de la prostaglandina y continuando durante 3 días hasta el empadre; los resultados mostraron que los tratamientos de pFSH en el extremo de fase progestacional no difieren de los tratamientos de pFSH sin fase progestacional; la tasa de ovulación que se obtuvieron con ambas estrategias fue baja, probablemente debido a la presencia de folículo dominante al inicio de las inyecciones de pFSH ya que no se controló la ola de emergencia ni la presencia de folículo dominante. Miragaya et al. (2006), informaron que cuando hay presencia de un folículo dominante de 5 mm o más en el momento de la aplicación de gonadotropinas induce el desarrollo sólo del folículo dominante y no de las cohortes.

Si la gonadotropina se inyecta al comienzo de la fase lútea, en la que una nueva onda folicular está surgiendo después de la ovulación, los resultados son muy satisfactorios. (Vivanco et al., 2010).

Se realizaron recientes trabajos de superovulación y transferencia de embriones con el fin de evaluar regímenes hormonales y desarrollar procedimientos adecuados para establecer protocolos de superovulación, colecta y transferencia de embriones; es así que Vivanco et al., (2010), determinaron una superioridad significativa para la producción de embriones transferibles con la aplicación de la hormona eCG donde se obtuvo 6.0 ± 3.16 cuerpos lúteos y 2.77 embriones promedio por alpaca; este resultado fue corroborado por Ponce, (2010), quien obtiene una producción de 3.25 ± 2.19 embriones con la misma hormona. En un trabajo posterior (Vivanco et al., 2011), se realizó una comparación del tratamiento con eCG y pFSH con la generación de una fase lútea natural dentro del tratamiento hormonal, donde los resultados obtenidos fueron 3.0 ± 2.87 blastocistos para eCG y 1.6 ± 2.67 para pFSH.

Vaughan et al., (2013), reportaron un gran número de colecciones de embriones en alpacas con y sin superovulación; de éstas: 1,636 donadoras fueron sometidas a un tratamiento superovulatorio en una fase lútea natural, utilizando acetato de buserelina como inductor de ovulación y pFSH para desarrollar la onda folicular superovulatoria, obteniendo un promedio de 6,6 ovulaciones y 2,6 embriones recuperados por donante.

1.5.5 Recuperación y transferencia de embriones

El primer trabajo reportado de colecta de embriones en camélidos sudamericanos fue realizado por Novoa y Sumar (1968), quienes superestimularon y colectaron embriones utilizando el método quirúrgico mediante lavado retrógrado del oviducto. En 1974, Sumar y Franco reportaron el nacimiento de la primera alpaca producto de transferencia de embriones, utilizando procedimiento quirúrgico tanto para la colecta y transferencia a las receptoras; más tarde se desarrollaron métodos no quirúrgicos que fueron inicialmente aplicados en llamas resultando en el nacimiento de una cría (Wilson W. y Chapman, 1985); dos preñeces (Bourke et al., 1990), y una preñez (Correa et al., 1992). Posteriormente numerosos investigadores han utilizado tanto la recuperación de embriones mediante la vía quirúrgica y no quirúrgica con resultados muy variables.

En los recientes reportes de Vivanco et al. (2010), Ponce (2010), Vivanco et al. (2011); y Vaughan et al., (2013); dan cuenta de un gran avance en la recuperación de embriones utilizando el método no quirúrgico con promedios de 3.52 ± 3.01 , 3.25 ± 2.19 , 3.01 ± 2.87 y 2.56 ± 1.99 embriones por donadora, respectivamente.

Con respecto a las tasas de preñeces conseguidas en transferencia de embriones, los resultados son muy variables, siendo más abundante los trabajos realizados en llamas a diferencia de las alpacas, los valores oscilan entre 0 a 50% (Bourke et al, 1995); no obstante, los resultados obtenidos por Huanca et al. (2006b) señalan una tasa de preñez de 68.9% en llamas

y 30% en alpacas. En Australia, Jane Vaughan et al., (2013), reportaron una tasa de preñez de 41.8% de 3963 transferencias embrionarias de alpacas en fresco por vía transcervical; sin embargo, en los últimos trabajos de Vivanco et al. (2013), se han logrado tasas más altas de preñez utilizando procedimiento quirúrgico para las transferencias por vía laparoscópica, donde los embriones fueron transferidos con una edad de 6.5 días a receptoras con sincronía de un día menos que las donadoras (5.5 días post inducción), obteniendo una tasa de preñez de 44.5%.

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

Las hembras donantes recuperan rápidamente la normalidad de su tracto reproductivo, esto es determinado por la ecosonografía que permite comprobar que el aspecto del útero es normal a las 3 semanas de lavado, y con un único servicio se logró una tasa de preñez del 40% (Huanca, 2008). En un estudio realizado por Franco et al., (2001), con 10 alpacas de fertilidad comprobada sometidas a superovulación y posterior recuperación de embriones utilizando un procedimiento quirúrgico, se pudo comprobar que el 70% de los animales quedaron preñadas en breve periodo; de la misma manera en el reporte de Pineda, (2012), al día 7 de la primera recuperación de embriones por método no quirúrgico, el 50% de las alpacas presentaron folículo preovulatorio; mientras que en el segundo lavado sucesivo sólo el 20% tuvo retorno folicular.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ubicación

El presente trabajo se realizó en el Fundo Mallkini ($14^{\circ}42'$ S; $69^{\circ}57'$ O), propiedad del grupo Michell, ubicado en el Distrito de Muñani, Provincia de Azángaro, Departamento de Puno, a 4,300 msnm, durante los meses marzo y abril de 2013.

2.2. Características geográficas.

El fundo Mallkini cuenta con una extensión de más de 3,000 hectáreas dedicadas a la crianza de alpacas y actividades complementarias como el turismo rural, apoyo social, manejo de medio ambiente e innovación científica. Forma parte de la puna húmeda en las cercanías de la cordillera oriental, los vientos húmedos que llegan al oeste desde la región atlántica al condensarse por el frío pueden provocar lluvias de hasta 2,500 mm por año que comienzan en octubre y se prolongan hasta abril, durante el resto del año la zona es seca; de relieve relativamente

accidentada, con llanuras de pendientes suaves, refleja diversos microambientes del Altiplano, con bofedales y pasturas abundantes destacando *Distichia muscoides*, *Plantago tubulosa*, y *Werneria pygmaea*; como principales fuentes de alimentación de las alpacas. Cuenta con una población de más de 4,500 alpacas aproximadamente, donde se viene haciendo trabajos de mejora genética desde el año 2007 a cargo de profesionales extranjeros y nacionales.

2.3. Materiales

Los materiales que se empleados para el presente estudio fueron los siguientes:

Cuadro 1: Materiales y equipos.

Ítem	Fases de la Investigación	Materiales
1	Búsqueda de información	Materiales de oficina
2	Selección de animales: hembras y machos	Libros de datos, pinturas Guantes de palpación, vaselina Ecógrafo, transductor rectal,
4	Tratamiento superovulatorio	Hormonas Jeringas y agujas
5	Recuperación y evaluación de embriones	Guantes de palpación Ecógrafo, Transductor rectal Catéter Foley 14 fr y mandril Sifón de 50 ml Medios de lavado y mantenimiento Estereoscopio y platina térmica Placas Petri Micropipetas y puntas Jeringas y agujas
6	Procesamiento y elaboración del informe	Materiales de oficina: Computadora, fotocopias, papeles

2.4. Metodología

2.4.1. Animales

En este estudio se utilizaron 17 alpacas hembra Huacaya como donadoras, entre 2 a 6 partos, las cuales estuvieron en periodo de lactación, con 40 días post parto aproximadamente; un peso promedio de 52 kg



Imagen 1: Selección de donadoras a través de palpación rectal.

Para la selección de los animales donantes se tomó en cuenta el mérito genético, la condición corporal (evaluación subjetiva al tacto), estado reproductivo y actividad ovárica (se determinó la presencia de estructuras en ambos ovarios con ayuda del ecosonógrafo, a través del recto). Aptas reproductivamente para programas de transferencias de embriones (Clínicamente sanas, libres de enfermedades reproductivas, adecuado estado anatómico y fisiológico del tracto reproductivo en general); asimismo, se evaluó a las hembras por dificultad de ingreso de la mano al recto, eliminándose aquellas que fueron estrechas.

Además de las alpacas donadoras se utilizaron 6 machos vasectomizados para inducir la ovulación y 8 machos enteros con mérito genético para el empadre a las donadoras superovuladas.



Imagen 2: Evaluación de actividad ovárica con el ecosonógrafo veterinario

Los animales estuvieron bajo pastoreo en pastos naturales de la zona, suplementado con heno de avena forrajera. Las alpacas donantes estuvieron distribuidas en grupos de 4 ó 5 animales al azar para el tratamiento diario.

Para la repetición del tratamiento superovulatorio se realizó una evaluación general a las mismas donadoras que participaron en el primer tratamiento, éstas fueron distribuidas al azar en grupos de tratamiento diario, sin considerar los grupos del primer tratamiento.

2.4.2. Tratamiento superovulatorio

En el presente estudio se utilizó un tratamiento superovulatorio en dos oportunidades consecutivas con un intervalo de 40 días entre colecciones embrionarias.

Este tratamiento se inició con la inducción de ovulación de las alpacas seleccionadas que presentaron folículos ≥ 7 mm. Para ello se hizo el empadre con machos vasectomizados y la aplicación post cópula de 0.0084 mg. de acetato de buserelina, vía intramuscular (Día 0); al día 2, se aplicó una dosis de 1000 UI de eCG y 5 días después (día 7) una dosis de 0.25 mg. de Cloprostenol, siendo empadradas 24 y 36 horas después, con machos enteros, se aplicó 0.0084 mg. de Acetato de Buserelina en la primera monta. Se colectaron los embriones 6.5 días posteriores a la primera monta.

La colección embrionaria fue no quirúrgica, por vía transcervical (Vivanco et al., 2011). Los embriones obtenidos fueron evaluados morfológicamente y clasificados según el sistema de la IETS (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones).

Cuadro 2: Protocolo de tratamiento superovulatorio.

Día	Actividad
Día 0	Observación del tamaño folicular e inducción a la ovulación (monta con machos vasectomizados y aplicación de GnRH) (pm).
Día 2	Verificación de ovulación y aplicación de eCG (pm).
Día 7	Aplicación de PGF (pm).
Día 8	Primer empadre y aplicación de GnRH (pm).
Día 9	Segundo empadre (am).
Día 15	Colecta de embriones y transferencia de embriones (am).

2.4.3. Colección de datos.

La colección de datos se realizó desde la selección de las donadoras, durante todo el tratamiento superovulatorio, colecta y transferencia de embriones; después de tomar los datos se procedió a evaluar cada uno de los parámetros evaluados.

2.4.4. Parámetros de evaluación.

a. Respuesta superovulatoria

La respuesta superovulatoria fue determinada por el número de cuerpos lúteos y número de folículos por hembra donante, ésta evaluación se realizó antes de la colecta mediante ecografía transrectal con un ecosonógrafo veterinario.



Imagen 3: Evaluación de respuesta superovulatoria previo al lavado embrionario.

b. Recuperación de embriones

La colección embrionaria se realizó por el método no quirúrgico, vía transcervical (Vivanco et al., 2011), previa evaluación ecográfica.



Imagen 4: Lavado embrionario vía transcervical.

Para la colección se utilizó un catéter Foley 14 fr de dos vías de balón 5 cc (Bioniche Animal Health, Inc.). el cual se posicionó en la parte distal del cuerno uterino con la ayuda de un mandril y se fijó insuflando el balón

con un volumen de 8 a 10 ml de solución fisiológica, dependiendo del lumen del cuerno uterino.



Imagen 5: Filtrado del medio de lavado recuperado

Una vez fijado el catéter se conectó a una jeringa de 50 ml con volumen de lavado de 30 a 40 ml para lavar 4 a 5 veces cada cuerno uterino, con masajes suaves en toda la superficie del cuerno. Los embriones se colectaron con medio Lactato Ringer Solution suplementado con 10% de medio de lavado.

Al finalizar este procedimiento se aplicó a todas las hembras donantes 0.25 mg de Cloprostenol sódico que es un análogo de $\text{PGF}_{2\alpha}$, para evitar que los embriones que no se recuperaron se queden en el tracto reproductivo de la donante.

La respuesta embrionaria estuvo determinada por el número de embriones recuperados por hembra donante lavada.

c. Clasificación de embriones

Después de realizar la colección de embriones, el medio de lavado recuperado fue pasado a través de un filtro Emcon (con diámetro de 75 μm .) y colocado en placas Petri cuadriculadas de 100 x 20 mm. Para la búsqueda de los embriones se utilizó un estéreo-microscopio de 10X a 40X de aumento.



Imagen 6: Búsqueda de embriones mediante el estéreomicroscopio.

Las estructuras encontradas fueron colocadas en una placa petri de 30 mm, en gotas con medio de mantenimiento (MDPBS, 0.4% BSA), utilizando para ello una micropipeta de 5-20 μl . Posteriormente los embriones viables fueron evaluados morfológicamente y clasificados según su estado y calidad: Excelente, Bueno, Regular, Pobre y Degenerado, según el sistema de IETS. (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones), como se observa en el cuadro 3.

Cuadro 3: Clasificación de embriones por calidad según la IETS

Grado 1	Excelente o Bueno	La masa embrionaria es simétrica y esférica, con blastómeros individuales uniformes en tamaño, color y densidad. El estado de desarrollo del embrión es consistente con la fase de desarrollo esperada. Presenta pocas irregularidades y por lo menos el 85% del material celular debe permanecer intacto dentro de la masa embrionaria. La zona pelúcida debe ser lisa y no debe tener ninguna superficie cóncava o delgada.
Grado 2	Regular	Presenta irregularidades moderadas en la forma global de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Por lo menos el 50% del material celular debe permanecer intacto dentro de la masa embrionaria.
Grado 3	Malo	Presenta irregularidades mayores en la forma de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Por lo menos el 25% del material celular debe permanecer intacto dentro de la masa embrionaria.
Grado 4	Degenerado o	Embriones degenerados, ovocitos o embriones de 1 célula: no viables.

Stringfellow, D., Seidel, G. 2000.

d. Respuesta al tratamiento superovulatorio sucesivo.

Para efectos de evaluar la respuesta del tratamiento de superovulación sucesivo, se agruparon los datos de las donadoras superovuladas la primera y segunda vez con intervalo de 40 días. Puesto

que para el estudio se restringió sólo a las alpacas que fueron sometidas dos veces al tratamiento superovulatorio.

2.4.5. Análisis estadístico.

La evaluación de la respuesta superovulatoria, número de estructuras recuperadas, clasificación de embriones y número de embriones transferibles, se realizó a través de estadística descriptiva de tendencia central y dispersión.

Para la evaluación del efecto que ejerce el número de superovulaciones sobre la respuesta ovárica y producción de embriones se utilizó la prueba F de análisis de varianza (ANOVA), así mismo se determinó el coeficiente de correlación de PEARSON:

$$r = \frac{\sum xy}{\sqrt{(\sum x^2)(\sum y^2)}}$$

para la tasa ovulatoria y la producción embrionaria entre las colecciones sucesivas, y así determinar el grado de relación existente entre las dos rondas de tratamiento superovulatorio.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. De la respuesta superovulatoria

La respuesta superovulatoria se evaluó con ecosonógrafo, y se determinó el número de cuerpos lúteos encontrados en cada ovario, previo a la colección. De un total de 22 alpacas tratadas para la primera ronda se descartaron 4/22 (18.2%) y 1/18 (5.6%) donadoras para la segunda ronda. Las hembras descartadas de la primera ronda 3 de ellas presentaron metritis subclínica reportado en el momento del lavado por el material purulento recuperado junto con el medio de lavado y una alpaca no respondió al tratamiento superovulatorio, mientras que la hembra descartada de la segunda ronda no presentó ninguna respuesta superovulatoria (0 CL). Las demás hembras respondieron satisfactoriamente al tratamiento.



Imagen 7: Vista ecosonográfica de Folículos.

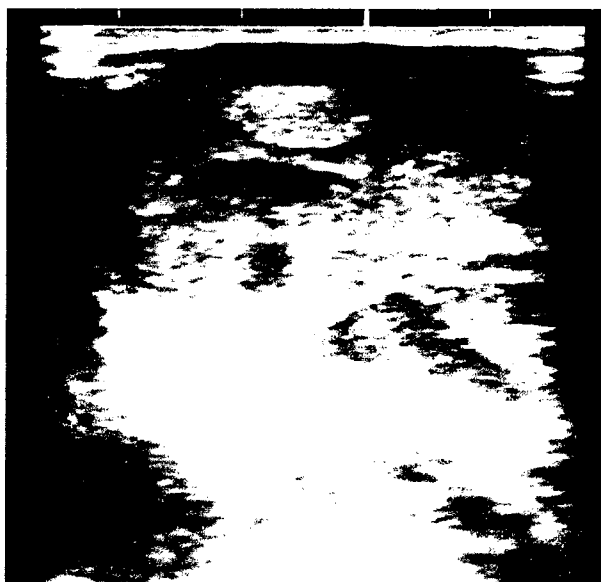


Imagen 8: Vista ecosonográfica de Cuerpos lúteos.

El número de cuerpos lúteos y número de folículos por hembra donante encontrados previo a la colección se muestra en el cuadro 4, donde se especifica la respuesta de cada ovario tanto para la primera colecta y la segunda colecta, no existiendo diferencia significativa ($P>0.05$) para los resultados del tratamiento superovulatorio y su repetición.

Cuadro 4: Respuesta superovulatoria al tratamiento sucesivo.

n=17	Derecha		Izquierda		Total	Total CL ²
	Fol.	CL	Fol.	CL	Fol. ¹	
Primera	1.35 ±	3.59 ±	1.47 ±	3.29 ±	2.82 ±	6.88 ±
ronda	1.27	0.80	2.18	1.69	2.86	2.15
Segunda	1.19 ±	3.31 ±	0.88 ±	3.5 ±	2.06 ±	6.81 ±
ronda	1.68	1.78	1.26	1.59	2.89	3.22
Acumu	2.56 ±	6.94 ±		6.81 ±	4.88 ±	13.82 ±
lado	1.86	2.08	2.25 ± 3	2.97	4.44	4.64

^{1,2}: P>0.05, sin diferencia significativa.

En cuanto al número de cuerpos lúteos encontrados, la media para el presente estudio fue de 6.88 ±2.15, para la primera ronda y 6.81 ± 3.22 para la segunda ronda, no encontrándose diferencia significativa (P>0.05) para el ovario izquierdo como el ovario derecho, corroborando los datos anteriormente reportados por otros autores. En cuanto a la presencia de folículos los valores medios obtenidos fueron de 2.82 ±2.86 y 2.06±2.89 para la primera y segunda ronda respectivamente, dando a notar que hubo un desarrollo folicular constante a causa del efecto prolongado del eCG; no obstante, la presencia de los folículos tuvieron una relación positiva con el posterior número de cuerpos lúteos presentes en los ovarios.

Los datos obtenidos son similares a los reportados para una sola colección embrionaria en la estación reproductiva por Ponce, (2010) y Vivanco et al., (2011), que obtuvieron respectivamente 6.75±2.38 y 6.70±2.20 cuerpos lúteos por alpaca superovulada; así también, la respuesta superovulatoria para el presente trabajo muestra una mayor

respuesta en comparación al reporte de J. Vaughan, (2013), quien tiene un promedio de 6.59 ± 4.78 CL por donante.

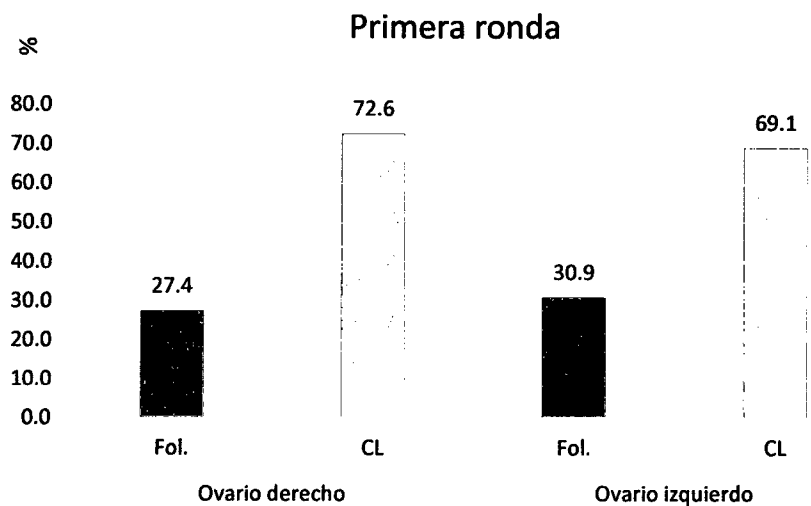


Gráfico 1: Porcentaje de cuerpos lúteos y folículos – Primera ronda

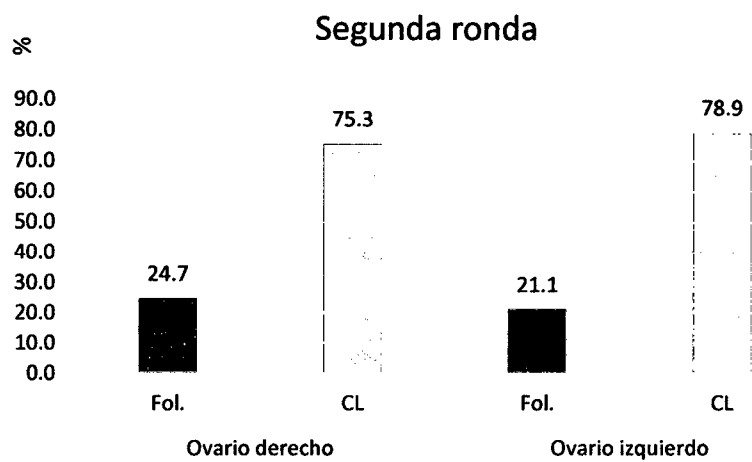


Gráfico 2: Porcentaje de cuerpos lúteos y folículos – Segunda ronda

La relación de cuerpos lúteos y folículos en los ovarios derecho e izquierdo como respuesta a los tratamientos superovulatorios sucesivos expresado en porcentajes no muestra diferencia significativa ($P>0.05$),

como se observa en los gráficos 1 y 2. Indicando que ambos ovarios tienen similar respuesta a la superovulación ovárica sucesiva.

3.2. De la respuesta embrionaria

De las 17 donadoras utilizadas en las dos repeticiones, se colectaron un total de 141 estructuras cuyos valores se observan en el cuadro 5.

Cuadro 5: Respuesta embrionaria al tratamiento superovulatorio sucesivo.

n=17	Primera Ronda	Segunda Ronda	Acumulado
Respuesta Ovulatoria	6.88±2.15	6.94±3.17	13.82±4.64
Respuesta Embrionaria	4.71±5.61	3.59±3.34	8.29±8.68
Tasa de recuperación embrionaria (N° Estructuras/CL)	68.38%	51.69%	60.00%
Tasa de recuperación de Blastocistos (Blastocistos/Estructuras)	88.75%	83.61%	86.52%

La tasa de recuperación de embriones fue de un 68.38% y 51.69% para la primera y segunda ronda respectivamente, estos resultados tienen una comparación favorable con respecto a otros reportes en alpacas como de Correa et al., (1997); Ratto et al., (1997); Huanca et al., (2009); J. Vaughan et al., (2013) cuyos valores reportados son de 34.5%, 16.9%, 41.1 y 41.4 respectivamente. Por tanto, los valores obtenidos en cuanto a la tasa de recuperación de embriones dan cuenta que se está produciendo un avance significativo en cuanto al uso de las biotecnologías reproductivas en alpacas.



Imagen 9: Embriones producidos por la donadora 1-4-745



Imagen 10: Embriones producidos por la donadora 1-9-026

Los valores medios del número de embriones recuperados fueron de 4.71 ± 5.61 y 3.59 ± 3.34 para la primera y segunda ronda respectivamente; éstos resultados son mayores a los reportes recientes de Vivanco et al., (2010); Ponce, (2010); Vivanco et al., (2011) quienes utilizaron eCG para el tratamiento superovulatorio logrando 3.52 ± 3.01 , 3.25 ± 2.19 , 3.0 ± 2.87 embriones por donadora respectivamente; así mismo, Vaughan et al., (2013) usando FSH en el protocolo de superovulación reportaron 2.56 embriones por donante, estos datos fueron recogidos de un total de 1,636 alpacas superovuladas durante varios años en Australia.

Mientras que Aller et al., (2010), lograron un menor número de embriones por colecta (1.5 ± 0.4 y 1.9 ± 0.4) usando también eCG como hormona para superovulación, igualmente Carretero et al. (2010) reportaron 1,9 embriones por colecta con la misma hormona. Por el contrario en un reporte anterior Huanca et al. (2009), obtuvieron 4.8 ± 2.8 embriones por colecta usando eCG para la superovulación.

La tasa de recuperación de blastocistos fue de 88.75% y 83.61% para la primera y segunda repetición, respectivamente; reflejando que un gran porcentaje de embriones está en la etapa de blastocisto lo cual hace más fácil el manejo e indica que el tiempo de colecta (6.5 días) post inducción es el más adecuado en relación colectas posteriores, con embriones de mayor edad.

Estos resultados donde ya se están obteniendo cerca de 4 embriones transferibles por alpaca donante, son muy significativos en comparación a

trabajos anteriores. Logrando tener protocolos eficientes para la producción de embriones de alpacas, así que con más apoyo a la investigación y desarrollo tecnológico, pronto se llegará a obtener resultados similares a los obtenidos a otras especies domésticas.

3.3. De la clasificación de embriones

Los embriones recuperados fueron evaluados y clasificados según su morfología por sistema de la IETS (Stringfellow y Seidel, 2000) como se observa en el cuadro 6.

Cuadro 6: Clasificación de embriones según el sistema de la IETS.

n=17	Estructuras ¹	Blastocitos ²	Bl. A	Bl. B	Bl. C	Mórulas	UFOs
Primera ronda	4.71 ± 5.61	4.18 ± 5.11	3.12 ± 3.57	1.06 ± 1.71	0	0.18 ± 0.53	0.35 ± 0.79
Segunda ronda	3.69 ± 3.42	3.13 ± 3.24	2.5 ± 2.22	0.13 ± 0.34	0.5 ± 1.51	0.31 ± 0.6	0.25 ± 1.0
Acumulado	8.29 ± 8.68	7.5 ± 8.16	5.75 ± 5.46	1.25 ± 1.81	0.5 ± 1.51	0.5 ± 0.73	0.63 ± 1.2

^{1,2}: P>0.05, sin diferencia significativa.

La clasificación de embriones de camélidos sudamericanos, no es precisa cuando se utiliza el sistema de clasificación de la IETS, ya que dicho sistema está diseñado para embriones bovinos. Por eso se debe tener especial interés en conocer mejor la morfología de los embriones de camélidos, para poder cuantificarlos de manera más precisa, y poder

Cuadro 7: Calidad de embriones expresado en porcentaje.

	Blastocisto				Mórula	UFO	Total
	Total	A	B	C			
Primera ronda	71 (88.8%)	53 (66.3%)	18 (22.5%)	0 (0%)	3 (3.8%)	6 (7.5%)	80 (100%)
Segunda ronda	51 (83.6%)	41 (67.2%)	2 (3.3%)	8 (13.1%)	6 (9.8%)	4 (6.5%)	61 (100%)

Primera ronda

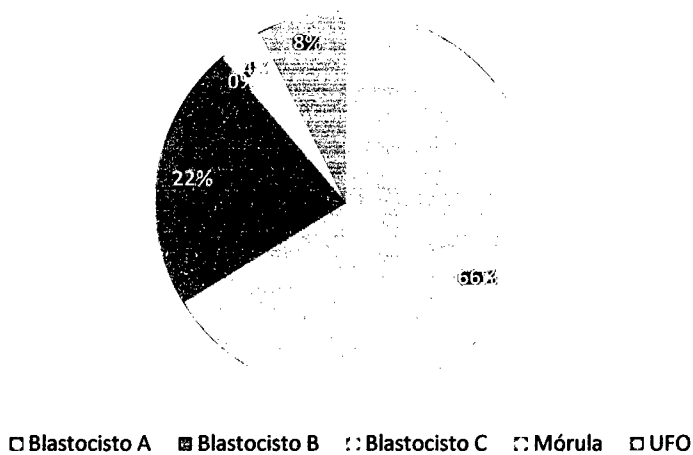


Gráfico 3: Distribución de los embriones obtenidos según calidad –
Primera ronda

Segunda ronda

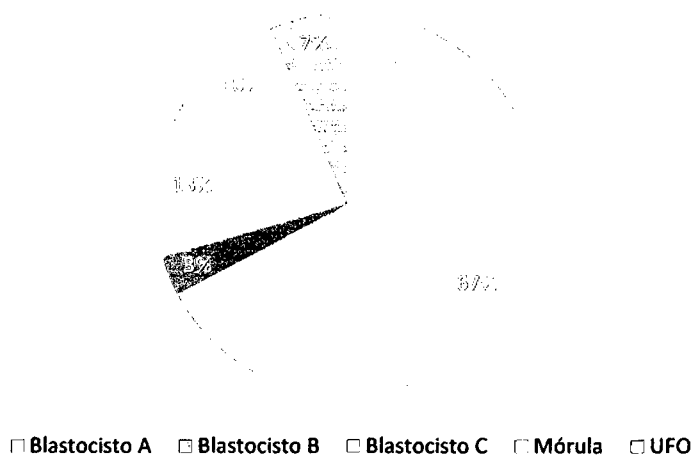


Gráfico 4: Distribución de los embriones obtenidos según calidad - Segunda ronda

De total de estructuras colectadas para la primera y segunda ronda, el 66.25% y 67.21% respectivamente fueron blastocistos de calidad A, estos valores muestran que no se encontró diferencia significativa ($P>0.05$) en el porcentaje de los embriones de calidad excelente para ambas rondas.

3.4. De la respuesta al tratamiento superovulatorio sucesivo.

Los resultados de este estudio muestran que no hay diferencia significativa ($P>0.05$) en el número de CL y en el número de embriones transferibles entre la primera y segunda ronda consecutiva de superovulación y colección embrionaria.

Cuadro 8: Comparación de datos mediante la prueba de F del total de folículos, cuerpos lúteos, estructuras colectadas, embriones transferibles y blastocistos entre la primera y segunda ronda.

Variables	n=17	Primera ronda	Segunda ronda	Prueba F
Total folículos	Cantidad	48	35	
	$\bar{x} \pm DS$	2.82 ± 2.86	2.06 ± 2.79	0.93
Total Cuerpos lúteos	Cantidad	117	118	
	$\bar{x} \pm DS$	6.88 ± 2.15	6.94 ± 3.17	0.13
Estructuras Colectadas	Cantidad	80	61	
	$\bar{x} \pm DS$	4.71 ± 5.61	3.59 ± 3.34	0.05
Embriones transferibles	Cantidad	74	57	
	$\bar{x} \pm DS$	4.35 ± 5.13	3.35 ± 3.22	0.07
Blastocistos	Cantidad	71	51	
	$\bar{x} \pm DS$	4.18 ± 5.11	3 ± 3.18	0.07

De acuerdo a los datos observados en el cuadro 8, se aprueba que no existen diferencias significativas ($P>0.05$) entre los datos evaluados, es decir, los animales (n=17) respondieron en forma semejante en la primera y segunda superovulación para el total de folículos, total de cuerpos luteos, estructuras colectadas, embriones transferible y blastocistos totales; vale decir, la respuesta de las donadoras en la segunda superovulación fue tan igual como la primera vez, esto tras la administración exógena de hormonas y manipulación de sus órganos reproductivos, factores que no afectaron su fisiología ovárica y respuesta a la estimulación hormonal exógena.

De otro lado, la alta variabilidad de los datos encontrados en las donadoras, permite realizar la selección de aquellas alpacas que poseen mayor predisposición a la respuesta superovulatoria y la producción de embriones.

El coeficiente de correlación del número de CL entre la primera y segunda superovulación consecutiva fue de 0.5, valor considerado mediano, y el del número de embriones transferibles entre colecciones consecutivas fue de 0.83, considerado alto.

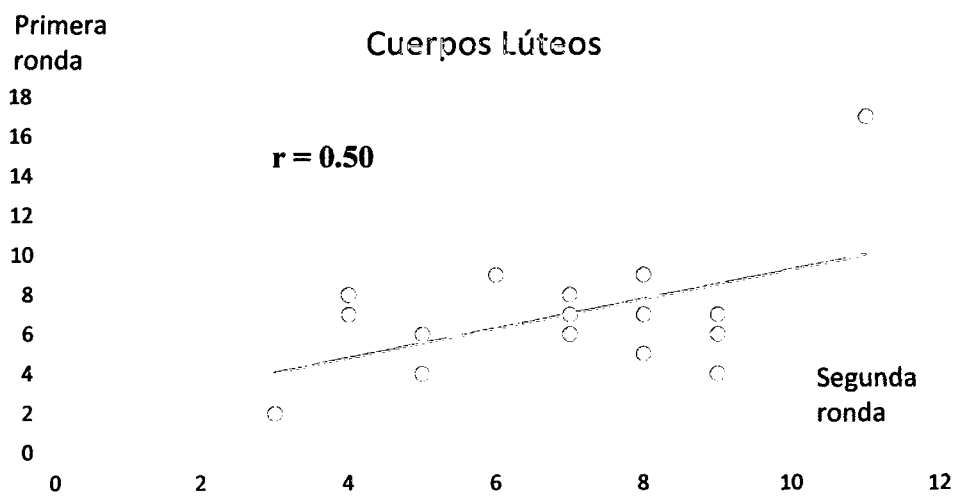


Gráfico 5: Coeficiente de correlación para el número de cuerpos lúteos para la primera y segunda superovulación

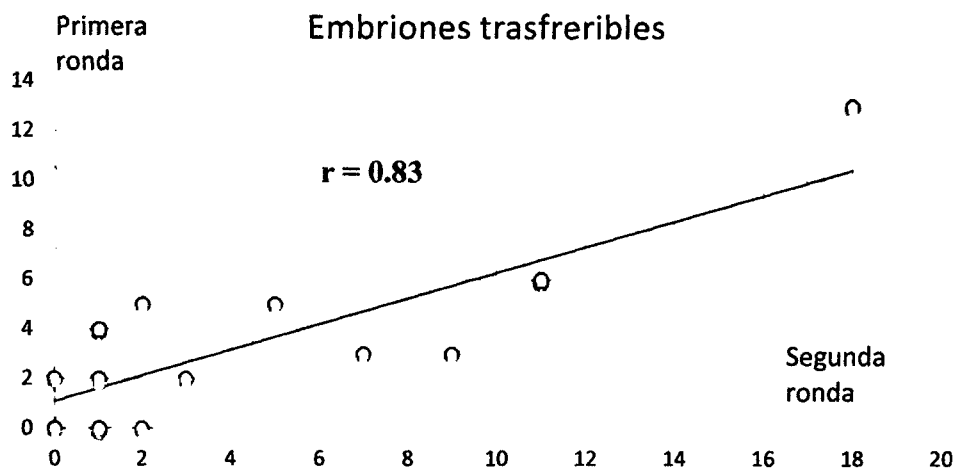


Gráfico 6: Coeficiente de correlación para el número de embriones transferibles para la primera y segunda superovulación

Estos resultados indican que hay una tendencia de las alpacas a repetir su respuesta superovulatoria entre colecciones sucesivas y una comprobada eficiencia en la respuesta ovárica y producción de embriones transferibles entre colecciones; esta misma tendencia ha sido observada en otros rumiantes y está relacionada con los niveles de AMH (Hormona Antimuleriana) en cada individuo (Monniaux, D., 2012).

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

- ✓ El número de cuerpos lúteos observados en la primera y segunda ronda fue de 6.88 ± 2.15 y 6.94 ± 3.17 , respectivamente, no habiendo diferencia significativa ($P > 0.05$) entre ambos valores. Así mismo, se observó que la presencia de cuerpos lúteos para ambas rondas, fue de 50.64 y 49.36 % para el ovario derecho e izquierdo, respectivamente, siendo igualmente funcionales ante una estimulación exógena.
- ✓ No se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) para el número de embriones recuperados en la primera ronda (4.71 ± 5.61) y en la segunda ronda (3.59 ± 3.34), observándose que los embriones transferibles fue de 4.35 ± 5.13 y 3.35 ± 3.22 para la primera y segunda ronda, respectivamente.

- ✓ No se encontró diferencia significativa ($P>0.05$) en la calidad de los embriones entre ambos tratamientos, encontrando un 88.75% y 83.61% de embriones en etapa de blastocisto para la primera y segunda repetición respectivamente.
- ✓ El tratamiento superovulatorio sucesivo en alpacas es eficiente tanto en la respuesta superovulatoria, producción y calidad de embriones.

4.2. RECOMENDACIONES

- Se sugiere determinar las relaciones entre folículos superestimulados, cuerpos lúteos y embriones recuperados frente a la cantidad de hormona utilizada en el tratamiento superovulatorio.
- En cuanto a la clasificación de embriones de camélidos sudamericanos, es necesario validar el sistema de acuerdo a la cronología de desarrollo y valoración morfológica para estas especies.
- Se sugiere realizar más trabajos relacionados a la aplicación de biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos y con ello aportar conocimientos científicos a la crianza de este recurso genético de esta manera participar en el desarrollo integral de la población altoandina

BIBLIOGRAFÍA

Aba, M.A., Forsberg, M., Kindahl, H., Sumar, J., Edqvist, L.E., 1995. Endocrine changes after mating in pregnant and non-pregnant llamas and alpacas. *Acta Vet. Scand.* 36, 489–498.

Aba, M.A., Kindahl, H., Forsberg, M., Quiroga, M., Auza, N., 2000. Levels of progesterone and changes in prostaglandin F2alpha release during luteolysis and early pregnancy in llamas and the effect of treatment with flunixin meglumine. *Anim. Reprod. Sci.* 59 (1–2), 87–97.

Adam C. L., Moir, C. E., Shiach, P. 1989. Plasma progesterone concentrations in pregnant and non-pregnant llamas (*Lama glama*). *Veterinary Record.* 125: 618–620.

Adams G. P., Griffin P. G., Ginther O. J. 1989. In situ morphologic dynamics of ovaries, uterus, and cervix in llamas. *Biology of Reproduction.* 41: 551.

Adams, G.P., Sumar, J., Ginther, O.J., 1990. Effects of lacational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *J. Reprod. Fertil.* 90, 535–545.

Adams, G.P., Sumar, J., Ginther, O.J., 1991a. Form and function of the corpus luteum in llamas. *Anim. Reprod. Sci.* 24, 127–138.

Adams, G.P., Sumar, J., Ginther, O.J., 1991b. Hemorrhagic ovarian follicles in llamas. *Theriogenology* 35, 557–568.

Adams, G., 1998. Control of ovarian follicular wave dynamics in mature and prepubertal cattle for synchronization and superstimulation. *Proc. World Buiatrics Congress*, 595–605.

Adams, G., 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. J. Reprod. Fertil. Suppl. 54, 17–32.

Adams G. P. y Ratto M. H. 2001. Reproductive biotechnology in South American Camelids. Rev. Inv. Vet. Perú. Suppl. 1, 134 -141.

Agüero, A., Miragaya, M.H., Ferrer, M.S., Capdevielle, E.F., Chaves, M.G., Rutter, B., 2001a. Follicular dynamics in *Vicugna vicugna*. Theriogenology.

Alberio R. H. y Aller J. F. 1996. Control y sincronización de la onda folicular mediante la aplicación de progesterona exógena en llamas. Rev. Arg. Prod. Anim.

Aller, J.F., Cancino, A.K., Rebuffi, G.E., Alberio, R.H., 2010. Effect of estradiol benzoate used at the start of a progestagen treatment on superovulatory response and embryo yield in lactating and non-lactating llamas. Anim. Reprod. Sci. 119, 322–328.

Bravo, P.W., Sumar, J., 1989. Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. Anim. Reprod. Sci. 21, 271–281.

Bravo P. W., Fowler M. E., Stabenfeldt G. H., Lasley B. L. 1990a. Ovarian follicular dynamics in the llama. Biology of Reproduction. 43: 579–585.

Bravo, P.W., Fowler, M.E., Stabenfeldt, G.H., Lasley, B., 1990b. Endocrine responses in the llama to copulation. Theriogenology 33, 891–899.

Bravo P. W, Stabenfeldt G. H., Lasley B. L., Fowler M.E. 1991. The effect of ovarian follicle size on pituitary and ovarian responses to copulation in domesticated South American camelids. Biology of Reproduction. 45.

Bravo, P.W., Stabenfeldt, G.H., Fowler, M.E., Lasley, B.L., 1992. Pituitary response to repeated copulation and/or gonadotropin-releasing hormone administration in llamas and alpacas. *Biol. Reprod.* 47, 884–888.

Bravo, P.W., Stabenfeldt, G.H., Fowler, M.E., Lasley, B.L., 1993. Ovarian and endocrine patterns associated with reproductive abnormalities in llamas and alpacas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202, 268–272.

Bravo, P.W., 1994. Reproductive endocrinology of llamas and alpacas. *Vet. Clin. N.: Am. Food Anim. Pract.* 10, 265–279.

Bourke, D.A., Adam, C.L., Kyle, C.E., 1992a. Ultrasonography as an aid to controlled breeding in the llama (*Lama glama*). *Vet. Rec.* 130, 424–428.

Bourke, D.A., Kyle, C.E., McEvoy, T.G., Young, P., Adam, C.L., 1995a. Superovulatory responses to eCG in llamas (*Lama glama*). *Theriogenology* 44, 255–268.

Bourke D. A., Kyle C.E., McEvoy T. G., Young P., Adam, C.L., 1995b. Recipient synchronization and embryo transfer in South American camelids. *Theriogenology*.

Brown B. W. 2000. A review on reproduction in South American camelids. *Animal Reproduction Science.* 58: 169-310.

Carretero, M.I., Miragaya, M., Chaves, M.G., Gambarotta, M., Agüero, A., 2010. Embryo production in superstimulated llamas pre-treated to inhibit follicular growth. *Small Ruminant Res.* 88, 32–37.

Chaves M. G., Aba M. A., Agüero A., Egey J., Berestin V. y Rutter B. 2002. Ovarian follicular wave pattern and the effect of exogenous

progesterone on follicular activity in non-mated llamas. *Animal Reproduction Science*. 69.

Correa, J.E., Gatica, R., Ratto, M., Ladrix, R., Schuler, C., 1992. Studies on nonsurgical recovery of embryos from Southamerican camelids. In: *Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction*, vol. 2, The Hague, 23–27 August, pp. 788–790.

Correa J., Ratto M. H. y Gatica R. 1997. Superovulation in llamas (*Lama glama*) with pFSH and equine chorionic gonadotrophin used individually or in combination. *Animal Reproduction Science*. 46, 289-296.

Cervantes M., Huanca T., Palomino J. M., Huanca W. 2008. Evaluation of the ovarian response in alpacas treated with Follicle Stimulating Hormone (FSH).

Del Campo, M.R., Del Campo, C.H., Ginther, O.J., 1996. Vascular provisions for a local utero-ovarian cross-over pathway in New World camelids. *Theriogenology* 46, 983–991.

Del Campo M. R., Toro F., Von Baer A., Montecinos S., Donoso X. y Von Baer L. 2002. Morphology and physiology of llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama paco*) embryos. *Theriogenology*. 57, 581.

England, B.G., Foote, W.C., Matthews, D.H., Cardozo, A.G., Riera, S., 1969. Ovulation and corpus luteum function in the llama (*Lama Glama*). *J. Endocr.* 45, 505–513.

England, B.G., Foote, W.C., Cardozo, A.G., Matthews, D.H., Riera, S., 1971. Oestrus and mating behaviour in the llama (*Lama glama*). *Anim. Behav.* 19, 722–726.

Fernández-Baca, S., Hansell, W., Novoa, C., 1970a. Corpus luteum function in the alpaca. *Biol. Reprod.* 3, 252–261.

Fernández-Baca, S., Madden, D.H.L., Novoa, C., 1970b. Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca. *J. Reprod. Fertil.* 22, 261–267.

Fernández-Baca, S., Novoa, C., Sumar, J., 1972a. Actividad reproductiva en la alpaca mantenida en separación del macho. *Mem. ALPA* 7, 7–18.

Fernández-Baca, S., Sumar, J., Novoa, C., 1972b. Comportamiento sexual de la alpaca macho frente a la renovación de las hembras. *Rev. Invest. Pecuarias* 1, 115–128.

Fernández-Baca, S., Sumar, J., Novoa, C., Leiva, V., 1973. Relación entre la ubicación del cuerpo lúteo y la localización del embrión en la alpaca. *Rev. Inv. Pec.* 2, 131–135.

Fernández-Baca, S., Hansell, W., Saatman, R., Sumar, J., Novoa, C., 1979. Differential luteolytic effects of right and left uterine horns in alpaca. *Biol. Reprod.* 20, 586–595.

Ferrer, M.S., Agüero, A., Flores, M., Rutter, B., 1999. Citología vaginal en distintas fases de la dinámica folicular en la llama (*Lama glama*). *Revista Brasileira Reprod. Anim.* 23, 207–209.

Fowler M. E. y Bravo W. 2010. *Medicine and Surgery of Camelids*. Third Edition. 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014-8300, USA. Wiley – Blackwell. Cap: 17.

Gamarra G., Gallegos A., Asparrin M. and Vivanco-Mackie H. W. 2007. 244 Development of superovulatory strategies in alpacas. *Reproduction, Fertility and Development* 19:238–238.

Hafez ESE, Hafez B. 2002. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 4 Ed. México. McGraw-Hill Interamericana. 519 p.

Huanca W., González M., Cordero A. y Huanca T. 2006a. Comportamiento reproductivo de donadoras de embriones, después de un protocolo de superovulación en llamas. Resumen V Congreso Mundial de Camélidos, Catamarca–Argentina.

Huanca W., Ratto M., Cordero A., Santiani A., Huanca T., Cárdenas O. y Adams G. P. 2006b. Respuesta ovárica y transferencia de embriones en alpacas y llamas en la zona altoandina del Perú. Resumen V Congreso Mundial de Camélidos, Catamarca–Argentina.

Huanca, T. 2008. Efecto de la administración de gonadotropinas exógenas en la respuesta ovárica y la producción de embriones en alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis doctorado. Universidad de Santiago de Compostela.

Huanca, W., Cordero, A., Huanca, T., Cardenas, O., Adams, G.P., Ratto, M.H., 2009. Ovarian response and embryo production in llamas treated with equine chorionic gonadotropin alone or with a progestin-releasing vaginal sponge at the time of follicular wave emergence. *Theriogenology* 72.

Instituto Nacional de Estadística e Informática. IV Censo Nacional Agropecuario.-2012. 2013.

Knight, T.W., Death, A., Wyeth, T., Hill, F., 1992. Effects of GnRH and of single versus multiple mating on the conception rate in alpacas. Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod. 52, 311–312

Miragaya, M.H., Aba, M.A., Capdevielle, E.F., Ferrer, M.S., Chaves, M.G., Rutter, B., Aguero, A., 2004. Follicular activity and hormonal secretory profile in vicuna (*Vicugna vicugna*). Theriogenology 61, 663–671.

Miragaya M. H., Chaves M. G., Agüero A. 2006. Reproductive biotechnology in South American camelids. Small Ruminant Research. 61: 299-310.

Monniaux, D. 2012. Superovulatory responses and embryo production in ruminants: Lessons from the ovaries. Proceedings 28th Annual Meeting A.E.T.E.- Saint Malo, France, 7th – 8th September 2012. P 7-27.

Novoa, C., Sumar, J., 1968. Colección de huevos in vivo y ensayo de transferencia en alpaca. En: Boletín Extraordinario IVITA. Univ. Nacional Mayor de San Marcos, Lima (Perú) Pp. 31–34.

Novoa, C., 1970. Reproduction in Camelidae. A review. J. Reprod. Fertil. 22, 3–20.

Novoa, C., Franco, E., García, W., Pezo, D., 1999. Dosis de gonadotropinas (eCG Y hCG), superovulación y obtención de embriones en alpacas. Rev. Inv. Vet. del Perú Vol. 10, Nº 1 Enero-Julio

Pineda J., Pozo A., Huanca T., Naveros M. L. 2012. Recuperación sucesiva de embriones y retorno folicular post lavado en alpacas (*Vicugna pacos*) huacaya donadoras naturales.

Pollard, J.C., Littlejohn, R.P., Scott, I.C., 1994. The effects of mating on the sexual receptivity of female alpacas. *Anim. Reprod. Sci.* 34, 289–297.

Ponce Salazar D. 2010. Recuperación de embriones de alpacas con dos tratamientos superovulatorios. Tesis Ing. Zoot. Universidad Nacional Agraria La Molina.

Ratto M. H., Singh J., Huanca W. y Adams G. P. 2003. Ovarian follicular wave synchronization and pregnancy rate after fixed-time natural mating in llamas. *Theriogenology*. 60, 1645-1656.

San Martin M., Copaira M., Zuñiga J., Rodreguez R., Bustinza G., Acosta L. 1968. Aspects of reproduction in the alpaca. *Journal of Reproduction and Fertility*.

Skidmore, J.A., Starbuck, G.R., Lamming, G.E., Allen, W.R., 1998. Control of luteolysis in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *J. Reprod. Fertil.* 114, 201–209.

Smith, C.L., Peter, A.T., Pugh, D.G., 1994. Reproduction in llamas and alpacas: a review. *Theriogenology* 41, 573–592.

Sumar, J., 1983. Studies on reproductive pathology in alpacas. M.Sc. Thesis, Department of Obstetrics and Gynaecology, College of Veterinary Medicine, Swedish University of Agriculture and Science, Uppsala.

Sumar, J., 1985. Reproductive physiology in South American camelids. In: Land, R.B., Robinson, D.W. (Eds.), *Genetics of Reproduction in Sheep*. Butterworths, London. Pp. 81–95.

Sumar J., Fredriksson G., Alarcón V., Kindahl H., Edqvist L. E. 1988. Levels of 15-keto-13, 14-dihydro- PFG2 α , progesterone and oestradiol-17 β after induced ovulations in llamas and alpacas. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 29: 339–346.

Sumar, J., Bravo, P.W., Foote, W.C., 1993. Sexual receptivity and time of ovulation in alpacas. *Small Rumin. Res.* 11, 143–150.

Sumar J. B. 1996. Reproduction in llamas and alpacas. *Animal Reproduction Science*. 42: 405–415.

Sumar, J.B., Adams, G., 1997. Reproductive anatomy and physiology of the female llama. En: Youngquist, R.S. (Ed.), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. WB Saunders, Philadelphia, USA Pp. 792–798.

Sumar, J.B., 1999. Reproduction in female South American domestic camelids. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54, 169–178.

Stringfellow, D., Seidel G. 2000. *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 3ra Edición. IETS. Illinois, EUA. Pp. 181.

Taylor S., Taylor P. J., James A. N., Denniston R. S. y Godke R. 2001. Alpaca offspring born after cross species embryo transfer to llama recipients. *Theriogenology*. 53, 1-344.

Tibary, A., Anouassi, A., 1997. *Theriogenology in Camelidae*. Abu Dhabi Printing, Mina, Abu Dhabi, EAU.

Tibary A., Memon M.A., 1999. Reproductive physiology in the female South American camelidae 6, 217–233.

Tibary, A., 2001a. Fertilization, embryo and fetal development in camelids. En: Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenology, Vancouver, BC, Canadá, 12–15 Setiembre. Pp. 387–396.

Tibary, A., 2001b. Approach to diagnosis of infertility in camelids. En: Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenology, Vancouver, BC, Canadá, 12–15 Setiembre. Pp. 407–416.

Vaughan, J.L., 2001. Control of ovarian follicular growth in the alpaca (*Lama pacos*). Ph.D. Thesis. Central Queensland University. 2001.

Vaughan, J.L., Macmillan, K.L., Anderson, G.A., D'Occhio, M.J., 2003. Effects of mating behaviour and the ovarian follicular state of female alpacas on conception. Aust. Vet. J. 81, 86–90.

Vaughan J. L., Macmillan K. L., D'Occhio M. J. 2004. Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. Animal Reproduction Science. 80 (3-4): 353-361

Vaughan J. L. 2012, practical aspects of embryo transfer and artificial insemination in south american camelids. VI Congreso Mundial De Camélidos Sudamericanos.

Vaughan J. L. et al. 2013. Factors influencing embryo transfer success in alpacas – A retrospective study. Animal Reproduction Science 136 (2013) 194– 204

Vivanco H. W. 1999. Alpacas, Some Reproductive Aspects and application of Reproductive Technologies. Alpaca & Llama Association-New Zealand Inc. 1999 Conference Notes. Auckland. June 1999.

Vivanco H. W. 2002. Programa de rescate y mejoramiento genético de los camélidos sudamericanos mediante la aplicación de tecnologías reproductivas avanzadas. Hamilton, Nueva Zelanda.

Vivanco H. W., Huamán E., León S., Gallegos A., Asparrin M., Alvarado E., Gamarra G. 2010. Evaluation of superovulatory regimes for in vivo embryo production in alpacas (*Lama pacos*).

Vivanco H. W., Huaman E., Leon S., Nunez T., Gregoire A., Ponce D., Alvarado E., Asparrin M.. 2011. Comparison Between Equine Chorionic Gonadotropin and Porcine Follicle Stimulating Hormone for in Vivo Production of Embryos in Alpacas (*Vicugna Pacos*) Showing Natural Luteal Phase After Induction of Ovulation. *Reproduction, Fertility and Development* 23 (1): 182.

Vivanco Mackie Henry William. Strategies for superovulation, embryo production and transfer in sheep and alpacas. 29th Annual Meeting A.E.T.E. – Istanbul, Turkey- 6th and 7th of September 2013

Vivanco H. W., Ponce D., Miguel M., Asparrin M. 2013. Comparative efficiency of gonadotropin-releasing hormone and luteinizing hormone in the induction of ovulation in superovulated alpacas. *Reproduction, Fertility and Development* 26(1) 168-168.

Wilson Wiepz D., Chapman R. J. 1985. Non-surgical embryo transfer and live birth in a llama. *Theriogenology*. 24: 251-257.

ANEXOS

ANEXO 1: Evaluación ecosonográfica de ovarios y embriones obtenidos - Primera ronda.

Fecha	Donadora	Macho	O. derecho		O. izquierdo		Est. total	Blastocisto				Mórula	UFO
			Fol	Cl	Fol	Cl		Total	A	B	C		
16-mar	2-4-599	1-7-342	2	5	0	4	2	2	2	0	0	0	0
16-mar	2-9-513	2-6-505	0	4	0	4	1	1	1	0	0	0	0
16-mar	1-9-703	1-9-061	2	4	1	1	1	1	1	0	0	0	0
16-mar	1-4-745	1-8-698	0	4	0	3	11	10	8	2	0	1	0
16-mar	1-6-142	2-8-546	1	3	4	1	1	1	1	0	0	0	0
17-mar	136-3-06	1-5-182	2	4	0	5	1	1	1	0	0	0	0
17-mar	2-8-480	12-7-12	0	3	4	1	1	1	0	1	0	0	0
17-mar	1-2-577	1-8-106	0	3	0	4	11	11	9	2	0	0	0
18-mar	1-6-128	2-4-123	0	3	0	2	2	2	2	0	0	0	0
18-mar	2-8-545	1-6-322	2	3	1	5	7	7	5	2	0	0	0
18-mar	1-8-320	2-9-837	2	3	1	4	9	9	5	4	0	0	0
19-mar	2-5-165	2-6-505	1	4	1	4	4	1	1	0	0	2	1
19-mar	1-9-030	1-6-692	4	2	8	1	1	0	0	0	0	0	1
19-mar	1-9-026	1-7-342	1	4	0	7	21	18	12	6	0	0	3
19-mar	1-9-047	1-9-109	1	5	2	4	0	0	0	0	0	0	0
20-mar	1-5-190	1-9-061	4	4	0	3	6	5	4	1	0	0	1
20-mar	1-8-319	1-7-111	1	3	3	3	1	1	1	0	0	0	0

ANEXO 2: Evaluación ecosonográfica de ovarios y embriones obtenidos - Segunda ronda.

Fecha	Donadora	Macho	O. derecho		O. izquierdo		Est.	Blastocitos				Mórula	UFO
			Fol	Cl	Fol	Cl		Total	A	B	C		
01-may	2-4-599	1-5-045	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0
03-may	2-9-513	1-5-045	1	2	0	3	2	1	1	0	0	1	0
04-may	1-9-703	1-9-061	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0
04-may	1-4-745	2-8-545	1	3	1	3	6	6	6	0	0	0	0
02-may	1-6-142	2-8-542	5	4	3	3	0	0	0	0	0	0	0
01-may	136-3-06	1-9-061	0	4	0	3	4	3	3	0	0	1	0
30-abr	2-8-480	1-6-322	5	3	4	5	4	4	4	0	0	0	0
01-may	1-2-577	2-6-505	0	3	0	4	6	6	4	1	1	0	0
02-may	1-6-128	2-9-837	1	3	1	3	5	5	5	0	0	0	0
30-abr	2-8-545	1-7-111	3	3	2	4	3	3	3	0	0	0	0
04-may	1-8-320	1-5-182	1	3	0	5	7	3	3	0	0	0	4
01-may	2-5-165	2-4-123	0	5	0	4	2	2	1	0	1	0	0
04-may	1-9-030	1-6-322	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
30-abr	1-9-026	2-9-837	1	9	2	8	13	12	6	0	6	1	0
03-may	1-9-047	1-9-061	0	3	0	3	2	0	0	0	0	2	0
01-may	2-5-190	12-7-012	0	3	0	3	5	5	4	1	0	0	0
02-may	1-8-319	1-6-692	0	5	2	4	2	1	1	0	0	1	0

ANEXO 3: Respuesta superovulatoria y producción de embriones acumulado

Donadora	O. Derecha		O. Izquierda		Est. Total	Blastocisto				Mórula	UFO
	Fol.	CL	Fol.	CL.		Total	A	B	C		
1-9-026	2	13	2	15	34	22	14	2	6	1	3
1-4-745	1	7	1	6	17	16	14	2	0	1	0
1-2-577	0	6	0	8	17	17	13	3	1	0	0
1-8-320	3	6	1	9	16	12	8	4	0	0	4
2-5-190	4	7	0	6	11	10	8	2	0	0	1
2-8-545	5	6	3	9	10	10	8	2	0	0	0
1-6-128	1	6	1	5	7	7	7	0	0	0	0
2-5-165	1	9	1	8	6	3	2	0	1	2	1
2-8-480	5	6	8	6	5	5	4	1	0	0	0
136-3-06	2	8	0	8	5	4	4	0	0	1	0
2-9-513	1	6	0	7	3	2	2	0	0	1	0
1-8-319	1	8	5	7	3	2	2	0	0	1	0
2-4-599	2	7	0	6	2	2	2	0	0	0	0
1-9-047	1	8	2	7	2	0	0	0	0	2	0
1-9-703	2	6	1	3	1	1	1	0	0	0	0
1-6-142	6	7	7	4	1	1	1	0	0	0	0
1-9-030	5	3	9	2	1	0	0	0	0	0	1